

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①1 N° de publication :

2 825 649

(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national :

01 07537

⑤1 Int Cl<sup>7</sup> : B 01 J 19/00, G 01 N 30/88, B 01 L 3/00

⑫

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 08.06.01.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 13.12.02 Bulletin 02/50.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : GELI FRANCOIS PAUL — FR.

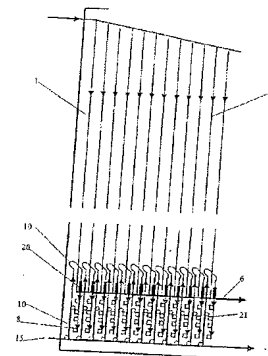
⑦2 Inventeur(s) : GELI FRANCOIS PAUL.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : CASALONGA ET JOSSE.

⑤4 SUPPORT POUR ANALYSE COMPARATIVES D'ÉCHANTILLONS SUR MICRO-COLONNES DE FRACTIONNEMENT AVEC GRADIENTS DE LONGUEUR, PHASES STATIONNAIRES ALTERNÉES, ET ELUTIONS DIGITALISÉES.

⑤7 Un dispositif d'analyse chimique ou biochimique d'échantillons biologique ou chimique, notamment pour une analyse comparative d'au moins deux échantillons, comprend une pluralité de micro-colonnes de fractionnement 2 de constituants d'un échantillon, chaque micro-colonne de fractionnement 2 comprenant un micro-canal muni d'un orifice d'introduction d'une phase mobile enrichi en échantillon, un orifice d'évacuation situé à une extrémité terminale et de moyens de séparation intermédiaires. Le dispositif comprend en outre des moyens fluidiques de capture 10 d'un produit de fractionnement au niveau d'un élément terminal de chaque micro-colonne de fractionnement 2 situé en amont de son orifice d'évacuation, et des ensembles de micro-leviers sélectifs 21 associés aux micro-colonnes de fractionnement 2, un micro-levier 21 comportant des moyens de détection reliés à des moyens d'analyse.



FR 2 825 649 - A1



Dans un certain nombre de situations en Chimie Analytique, on peut vouloir s'intéresser en priorité aux différences plutôt qu'aux similitudes de composition entre deux échantillons chimiques ou biochimiques. En Biologie en particulier, il existe une forte demande pour des techniques capables de cerner rapidement les différences de composition entre deux échantillons. C'est le cas en Protéomique.

5 En effet, chez les Eucaryotes, de la Levure à l'Homme, la Génomique Fonctionnelle et la Protéomique mettent en avant une diversité bien plus grande que celle qui apparaît seulement dans le strict déchiffrement du code génétique. Ainsi, chez l'Homme, après le séquençage des 25 000 gènes de l'Etre Humain n'est que la tâche initiale d'une entreprise qui va viser à connaître la fonction des gènes. Ces approches fonctionnelles vont se décliner tant sur une approche de recherche de voies intracellulaires et intercellulaires comprenant la notion de cascades d'interactions que sur une approche visant à  
10 rechercher les combinaisons d'expressions de gènes intervenant dans les seuils de progressions desdites cascades d'interactions cellulaires. Tant dans une vision de cascades d'interactions cellulaires qu'en considérant un mode combiné d'expression entre plusieurs gènes, on doit chercher à connaître l'état des modifications post-traductionnelles d'une protéine lorsqu'elle est exprimée pour exercer une  
15 fonction précise. Toujours chez l'Homme, certaines estimations conduisent à penser que 25 000 gènes sont potentiellement capables d'exprimer un million de protéines différentes.

En ce sens, chez tout Eucaryote, de la Levure à l'Homme, la Protéomique doit être considérée comme la finalité ultime des programmes de Génomique et de Génomique Fonctionnelle.

20

Cependant, devant une telle complexité potentielle, les premiers outils qu'il paraît logique de privilégier en Protéomique sont les outils d'expression différentielle. En d'autres termes, on se doit d'aller « droit au but » dans l'étude d'un processus physiologique ou pathologique. Il faut donc s'intéresser en priorité aux protéines différentiellement exprimées par ce groupe de cellules dans les  
25 deux situations physiologiques ou pathologiques d'intérêt.

Le gel 2D peut être considéré comme une première approche. Cependant, ses limites sont un manque d'exhaustivité, un manque de discrimination, une reproductibilité insuffisante et une inaptitude à l'étude des protéines hydrophobes.

30

#### ETAT DE L'ART DANS LES TECHNIQUES D'EXTRACTION ET DE SEPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE ET ELECTROPHORESE:

Les méthodes de préparation intégrée et d'extraction des échantillons biologiques reposant autant sur des principes chromatographiques que sur des principes électrophorétiques ont été reviewées dans  
35 l'article (Veraart JR, Lingeman H, Brinkman UA T. Coupling of biological sample handling and capillary electrophoresis. Journal of Chromatography A, 1999, 856, 483-514).

Concernant les peptides et les protéines, y compris les protéines hydrophobes, de nombreuses  
40 méthodologies d'extraction et d'enrichissement ont été rapportées (Herraiz T, Casal V. Evaluation of solid-phase extraction procedures in peptide analysis. Journal of Chromatography A, 1995, 708, 209, 221 ; Schweitz L, Petersson M, Johansson T, Nilsson S. Alternative methods providing enhanced sensitivity and selectivity in capillary electro-separation experiments. Journal of Chromatography A,

- Chromatography A, 2000, 892, 203-217; Bosserhoff A, Wallach J, Frank RW. Micropreparative separation of peptides derived from sodium dodecyl sulphate-solubilized proteins. J. Chromatogr, 1989, 473(1). 71-77; Huang JX, Guiochon G. Applications of preparative high-performance liquid chromatography to the separation and purification of peptides and proteins. J chromatography 1989, 492, 431-69; Rivasseau C, Vanhoenacker G, Sandra P, Hennion MC. On-line solid-phase extraction in Microcolumn- Liquid Chromatography coupled to UV or MS detection: application to the analysis of cyanobacterial toxins. J. Microcolumn separations, 2000, 12(5), 323-332; Kutter JP, Jacobson SC, Ramsey JM. Solid phase extraction on micro-fluidic devices. J. Microcolumn Separations, 2000, 12(2), 93-97.).
- 10 La problématique d'extraction et d'analyse des protéines membranaires a été décrite (Cf. Santoni V, Kieffer S, Desclaux D, Masson F, Rabilloud T. Membrane Proteomics: use of additive main effects with multiplicative interaction model to classify plasma membrane proteins according to their solubility and electrophoretic properties. Electrophoresis 2000. 21 (16). 3329-44; Santoni V, Dumas P, Rouquie D, Mansion M, Rabilloud T, Rossignol M. large scale characterization of plant plasma
- 15 membrane proteins. Biochimie 1999. 81(6). 655-61; Thomas TC, Mac Namee MG. Purification of membrane proteins. Methods in Enzymology. Vol 182, 499-520; Power SD, Lochrie MA, Poyton RO. Reversed-phase high performance liquid chromatographic purification of subunits of oligomeric membrane proteins. The nuclear coded subunits of yeast cytochrome c oxidase. J Chromatogr, 1983, 266, 585-98 ; Josic D, Hofmann W, Habermann R, Becker A, Reuter W. High performance liquid
- 20 affinity chromatography of liver plasma membrane proteins. J. of Chromatography A, 1987, 397, 39-46.; Lee RP, Doughty SW, Ashman K, Walker J. Purification of hydrophobic integral membrane proteins from mycoplasma hyopneumoniae by reversed-phase high performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A, 1996, 737, 273-279; Sivars U, Tjerneld F. . Mechanisms of phase behaviour and protein partitioning in detergent/polymer aqueous two-phase
- 25 systems for purification of integral membrane proteins . Biochimica et Biophysica Acta, 2000, 1474, 133-146; Ferro M, Seigneurin-Berny D, Rolland N, Chapel A, Salvi D, Garin J, Joyard J. Organic solvent extraction as a versatile procedure to identify hydrophobic chloroplast membrane proteins. Electrophoresis 2000, 21, 3517-3526; Stark M, Jornvall H, Johansson J. Isolation and characterization of hydrophobic polypeptides in human bile. Eur J Biochem 1999. 266(1). 209-14. )
- 30 .
- La purification des peptides très hydrophobes peut faire appel à des solvants organiques tels qu'un mélange de dichlorométhane-hexafluoro-2-propanol contenant des trace de pyridine avec un gradient linéaire acide formique-2-propanol et acide formique-eau sur une phase stationnaire non polaire telle que Vydac C4 (Cf. Bollhagen R, Schmiedberger M, Grell E. High performance liquid
- 35 chromatographic purification of extremely hydrophobic peptides : transmembrane segments .Journal of Chromatography A, 1995, 711, 181-186).
- L'utilisation de solvants non aqueux a été décrite en combinaison avec des techniques de séparation comme l'électrophorèse capillaire non aqueuse (Cf. Cottet H, Struijk MP, Van Dongen JIJ, Claessens
- 40 HA, Cramers CA . Non-aqueous capillary electrophoresis using non-dissociating solvents. Application to the separation of highly hydrophobic oligomers. Journal of Chromatography A, 2001, 915, 241-252; Veraart, J.R., Reinders, M.C., Lingeman, H. and Brinkman U.A. Non-aqueous capillary electrophoresis of biological samples after at-line solid-phase extraction. J. Chromatogr. A 811 (1998)

- 211-217; Yang, Q., Benson, L.M., Johnson, K.L. and Naylor, S. Analysis of lipophilic peptides and therapeutic drugs: on-line-nonaqueous capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J. Biochem. Biophys. Methods* 38 (1999) 103-121; Belder, D., Elke, K. and Husmann, H. Use of coated capillaries for nonaqueous capillary electrophoresis. *J. Microcol. Sep.* 11 (1999) 209-213; Lister, A.S., Dorsey, J.G. and Burton, D.E. Current measurement of nonaqueous solvents: applications to capillary electrophoresis and electrochromatography. *J. High Res. Chromatogr.* 20 (1997) 523-528; Belder, D., Husmann, H. and Warnke, Directed control of electroosmotic flow in nonaqueous electrolytes using poly ethylene glycol coated capillaries. *J. Electrophoresis* 22 (2001) 666-672 ; Bjørnsdottir, I. and Hansen, S.H. Comparison of separation selectivity in aqueous and non-aqueous capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 711 (1995) 313-322; Walbroehl, Y. and Jorgenson, J.W. Capillary zone electrophoresis of neutral organic molecules by solvophobic association with tetraalkylammonium ion. *Anal. Chem.* 58 (1986) 479-481 ; Wei, H. and Li, S.F.Y. Nonaqueous capillary zone electrophoresis for separation of free fatty acids with indirect fluorescence detection. *Electrophoresis* 19 (1998) 2187-2192 ; Raith, K., Wolf, R., Wagner, J. and Neubert, R.H.H. Separation of phospholipids by nonaqueous capillary electrophoresis with electrospray ionization mass spectrometry. *J. Microcol. Sep.* 10 (1998) 681-685 ; Drange, E. and Lundanes, E. Determination of long-chained fatty acids using non-aqueous capillary electrophoresis and indirect UV detection. *J. Chromatogr. A* 771 (1997) 301-309; Esaka, Y., Yoshimura, K., Goto, M. and Kano, K. Non-aqueous capillary zone electrophoresis using polyethylene glycol as a matrix agent. *J. Chromatogr. A* 822 (1998) 107-115; Jansson, M. and Roeraade. [N-Methylformamide as a separation medium in capillary electrophoresis. *J. Chromatographia* 40 (1995) 163-169 ; Esaka, Y., Inagaki, S., Uchida, D., Goto, M. and Kano, K. Polyacrylamides as hydrophilic selectors in non-aqueous capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 905 (2001) 291-297; Hansen, S.H., Tjørnelund, J. and Bjørnsdottir, I. Selectivity enhancement in capillary electrophoresis using non-aqueous media. *Trends Anal. Chem.* 15 (1996) 175-180; Jussila, M., Sundberg, S., Hopia, A., Mäkinen, M. and Riekkola, M.-L. Separation of linoleic acid oxidation products by micellar electrokinetic capillary chromatography and nonaqueous capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 20 (1999) 111-117 ; Jussila, M., Sinervo, K., Porras, S.P. and Riekkola, M.-L. Modified liquid junction interface for nonaqueous capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Electrophoresis* 21 (2000) 3311-3317; Koch, J.T., Beam, B., Phillips, K.S. and Wheeler, J.F. Hydrophobic interaction electrokinetic chromatography for the separation of polycyclic aromatic hydrocarbons using non-aqueous matrices. *J. Chromatogr. A* 914 (2001) 223-231 ; Li, S. and Weber, S.G. Separation of neutral compounds in nonaqueous solvents by capillary zone electrophoresis. *J. Am. Chem. Soc.* 122 (2000) 3787-3788 ; Miller, J.L., Khaledi, M.G. and Shea, D. Separation of hydrophobic solutes by nonaqueous capillary electrophoresis through dipolar and charge-transfer interactions with pyrylium salts. *J. Microcol. Sep.* 10 (1998) 681-685; Riekkola, M.-L., Wiedmer, S.K., Valkó, I.E. and Sirén, H. Selectivity in capillary electrophoresis in the presence of micelles, chiral selectors and non-aqueous media. *J. Chromatogr. A* 792 (1997) 13-35 ; Riekkola, M.-L., Jussila, M., Porras, S.P. and Valkó, I.E. Non-aqueous capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 892 (2000) 155-170 ; Sahota, R.S. and Khaledi, M.G. Nonaqueous capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* 66 (1994) 1141-1146 ; Steiner, F. and Hassel, M. Nonaqueous capillary electrophoresis: A versatile completion of electrophoretic separation techniques. *Electrophoresis* 21 (2000) 3994-4016; Tjørnelund, J., Bazzanella, A., Lochmann, H. and Bächmann, K. Coelectroosmotic separations of anions in non-aqueous capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 811 (1998) 211-217; Wang, T.;

Chromatogr. A 859 (1999) 203-219 ; Wright, P.B., Lister, A.S. and Dorsey, J.G. Behavior and use of nonaqueous media without supporting electrolyte in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography. Anal. Chem. 69 (1997) 3251-3259).

- 5 L'utilisation de surfactants zwitterioniques, comme C9-APSO4 ou C10-APSO4, respectivement 3 (nonyl-dimethyl-ammonio) propyl sulfate et 3 (decyl -dimethyl-ammonio) propyl sulfate, pour l'extraction-préconcentration d'espèces moléculaires hydrophobes (Cf. Saitoh T, Hinze WL. Concentration of hydrophobic organic compounds and extraction of proteins using alkylammoniosulfate zwitterionic surfactant mediated phase separations. Anal. Chem 1991, 63(21):2520-5.)
- 10 En jouant sur un équilibre entre les atomes de soufre et d'azote garantissant le caractère fortement zwitterionique d'une phase stationnaire constituée de monolithes macroporeux synthétisés in situ par photopolymérisation et contenant des copolymères à base de sulfoalkylbetaine (N,N-dimethyl-N-methacryloyloxyethyl-N-(3-sulfopropyl) ammonium betaine), des protéines basiques ont pu être
- 15 extraites par interactions chromatographiques et élution avec des solutions aqueuses de faible force ionique modulée par des ions chaotropiques tel que perchlorate et thiocyanate. (Cf. Viklund C, Sjorgen A, Irgum K, Nes I. Anal. Chem. 2001. Feb 1, 73,(3), 444-52). Les analytes basiques peuvent eux aussi être séparés en combinaison avec l'électrophorèse capillaire non aqueuse (Cf. Karbaum, A. and Jira, Th. Nonaqueous capillary electrophoresis: Application
- 20 possibilities and suitability of various solvents for the separation of basic analytes. Electrophoresis, 1999, 20, 3396-3401). Pour l'extraction et la séparation de protéines hydrophobes, la chromatographie par exclusion de taille peut aussi être utilisée avec des phases stationnaires apolaires et élution avec un mélange ternaire tel que (chloroforme-méthanol-acide trifluoro-acétique) (Cf. Bunger H, Kaufner L, Pison U. Quantitative
- 25 analysis of hydrophobic pulmonary surfactant proteins by high performance liquid chromatography with light-scattering detection. J. Chromatogr A, 2000, 18, 870 (1-2), 363-9.) Une méthode de rétro-extraction micellaire a été développée récemment: les protéines encapsulées à l'intérieur de micelles sont récupérées après destruction des micelles par un surfactant ayant une action contre-électrostatique (Cf. Jarudilokkul S, Poppenborg LH, Stuckey DC. Backward extraction of
- 30 reverse micellar encapsulated proteins using a counterionic surfactant. Biotechnol. Bioeng. 1999. 62 (5). 593-601.)
- La purification des glycoprotéines par chromatographie d'affinité aux lectines a été écrite (Cf. Gerard G, Purification of glycoproteins. Methods in Enzymology, vol 182, 529-539).
- 35 La purification de complexes multi-enzymatiques a été décrite (Cf. Srere PA, Matthews CK. Purification of Multienzyme Complexes. Methods in Enzymology, vol 182, 539-551).
- En Chimie Analytique, l'extraction et la chromatographie reposent en particulier sur la notion de polarité, qui provient d'une répartition asymétrique des nuages électroniques au sein des molécules.
- 40 Cette asymétrie est décrite par la notion de dipôles. L'existence d'un dipôle rend compte de la non-coïncidence du centre de gravité des charges positives portées par les atomes d'hydrogène (en fait des zones à faible densité électronique) avec le centre de gravité des charges négatives portées par les atomes d'oxygène ou d'azote voire de soufre (en fait des zones à forte densité électronique). Cette non

coïncidence peut être permanente (dipôle permanent), instantanée (dipôle instantané), ou induite (dipôle induit).

Lorsque des molécules peuvent subir, sous l'influence de charges électrostatiques d'autres molécules ionisées ou polarisées, une déformation de leurs orbitales électroniques, voire une modification de la position relative de ses atomes, elle sont dites polarisables. Ce sont les interactions de Debye (interaction (ion - dipôle induit) ou interaction (dipôle permanent - dipôle induit)), qui sont d'une énergie de 8 à 25 kJ/mole, et de London (interaction (dipôle instantané -dipôle induit)), qui sont d'une énergie de 5 à 20 kJ/mole.

Puisqu'il existe des degrés dans l'asymétrie de répartition de nuages électroniques, il existe des degrés dans la polarité des molécules. Une première molécule peut être plus polaire qu'une deuxième, mais moins polaire qu'une troisième.

L'existence de dipôles au sein de molécules dites "polarisées" résulte en une attraction mutuelle de toutes lesdites molécules polarisées, les zones de forte densité électronique, comme celles autour des atomes d'oxygène ou d'azote, voire de soufre, attirant les zones de faible densité électronique, comme celles autour des atomes d'hydrogène. C'est la raison pour laquelle deux espèces moléculaires polarisées vont s'attirer. Ce sont les interactions (dipôles permanents - dipôles permanents) de Keesom, qui sont d'une énergie de 25 à 40 kJ/mole. Ainsi, par exemple l'eau, composée de molécules polaires, et les molécules de cellulose, elles aussi molécules polaires, vont s'attirer, ce qui confère à cette dernière son caractère hydrophile. Lorsqu'on décrit l'attraction inter-moléculaire due à des dissymétries de nuages électroniques ou sont impliqués l'oxygène ou l'azote, voire le soufre, d'une part, et un groupement hydroxyle (-OH) d'autre part, on parle de liaisons hydrogène (les molécules portant l'oxygène ou l'azote et engagés dans une liaison hydrogène sont dits accepteurs de protons, et les molécules portant le groupement hydroxyle et engagés dans une liaison hydrogène sont appelées sont dits donneurs de protons.)

Les liaisons hydrogène, qui sont d'une énergie de 25 à 40 kJ/mole, résultent en fait d'un phénomène dynamique: le mouvement brownien, appelée aussi "agitation thermique", fait que ces liaisons se font et se défont en permanence. Elles ont donc d'autant moins d'impact que la température est élevée. La polarité d'une molécule a une influence directe sur sa solubilité dans un solvant polaire: une molécule polaire va pouvoir engager des liaisons hydrogène avec les molécules dudit solvant polaire, et se solubiliser plus facilement. En particulier dans l'eau, une molécule polaire sera plus facilement hydrosoluble. Une molécule apolaire sera plus facilement hydrophobe ou lipophile (l'hydrophobie ou la lipophilie d'un soluté selon Rekker est son coefficient de partage entre l'eau, qui a une très forte polarité, et le n-octanol, qui est beaucoup moins polaire).

D'une manière générale, l'échelle des polarités selon le type de molécules est la suivante:

35 eau>alcools>amines>amides>aldéhydes>cétones>esters>éthers>hydrocarbures.

En fait, les échelles de polarité sont conçues de plusieurs manières indépendantes qui en fait renvoient à des conséquences diverses des phénomènes de polarité:

- la première s'attache à mesurer l'énergie libre d'adsorption par unité de surface d'un solvant (avec une certaine polarité) à une phase solide (avec une certaine autre polarité). A titre d'exemple, cette méthode donne, par mesure d'adsorption sur l'alumine, les ordres de polarité suivants: eau>méthanol >éthanol>2-propanol> diméthylsulfoxyde> acétonitrile>méthyléthylcétone.

- la deuxième s'attache à mesurer expérimentalement (Rohrschneider) des coefficients de distribution de solutés tests entre plusieurs phases. A titre d'exemple, cette méthode donne les ordres de polarité suivants: eau> diméthylsulfoxyde> acétonitrile>méthanol>méthyléthylcétone>éthanol>2-propanol.
- 5 On peut déterminer dans la polarité globale de Rohrschneider la part des polarités partielles, c'est à dire respectivement les "pouvoir à accepter des protons", "pouvoir à donner des protons", "pouvoir à créer des interactions dipôle-dipôle". Il apparaît que les alcools sont surtout "accepteurs de protons", que l'acétonitrile et le méthyléthylcétone ont un "pouvoir à créer des interactions dipôles-dipôles", et que le diméthylsulfoxyde a autant un pouvoir à "accepter des protons" qu'à "créer des interactions dipôles-dipôles".
- 10
- La troisième s'attache à définir des paramètres de solubilité (Hildebrand et Scott), calculés à partir de l'énergie moléculaire de cohésion faisant le bilan de toutes les interactions inter-moléculaires d'un solvant, elle même calculée à partir de l'enthalpie molaire de vaporisation. A titre d'exemple, cette méthode donne les ordres de polarité suivants:
- 15 eau>méthanol>éthanol>diméthylsulfoxyde>acétonitrile> 2-propanol>méthyléthylcétone.

- La chromatographie de partage repose sur les solubilités différentielles des solutés entre deux phases liquides, plus précisément entre une phase liquide mobile et une autre phase liquide, dite stationnaire, épousant les mailles d'une phase solide poreuse de fine granulométrie.
- 20 La phase solide peut être polaire, telle que par exemple constituée de grains de gel de silice greffée avec des groupements aminopropyle ou paranitrobenzyle, ou alkylnitrile, ou glycéropropyle. En ce cas, la phase mobile, faiblement polaire, comme peut l'être un mélange (95 % hexane, 5% dichlorométhane) recevra un "modificateur polaire" pour donner un mélange à polarité accrue, comme (80 % hexane, 20% dichlorométhane), jusqu'à déplacer des solutés polaires interagissant avec la phase liquide polaire stationnaire. Il s'agit là de chromatographie de partage en phase normale.
- 25 Mais la phase solide peut aussi être apolaire, comme des matrices telles que matrice copolymère styrène-divinylbenzène, ou bien matrice pyrocarbone, ou gels de silice greffés avec des groupements fonctionnels apolaires, tels que par exemple des groupements alkyle ou phenyl. En ce cas, la phase mobile, polaire, comme peut l'être un mélange (40% méthanol ou acétonitrile, 60% eau), recevra un "modificateur polaire" pour donner un mélange à polarité moindre (60 % méthanol ou acétonitrile, 40 % eau), jusqu'à déplacer des solutés apolaires interagissant avec la phase liquide apolaire stationnaire. Il s'agit là de chromatographie de partage en phase inversée.
- 30
- 35 Les autres techniques chromatographiques de séparation reposent une rétention différentielle de solutés contenus dans une phase mobile, liquide ou gazeuse, qui traverse une phase stationnaire solide. Selon la technique utilisée, le mode de rétention est la taille, l'adsorption ou l'affinité.

- 40 La chromatographie par exclusion de taille repose sur une phase stationnaire constituée de billes poreuses formant un gel. La distribution des diamètres des pores à l'intérieur des billes poreuses correspond à une fourchette assez large. Selon leur encombrement stérique, les molécules peuvent ou non passer à l'intérieur d'un plus ou moins grand nombre de pores des billes poreuses. Celles qui

passent le plus facilement à l'intérieur des pores des billes poreuses sont les plus retardées. Dans la pratique, le phénomène est biaisé par des interactions ioniques ou hydrophobes entre les solutés et la phase stationnaire. Par ailleurs des effets parasites - comme ceux causés par un écoulement turbulent de la phase mobile, ou bien comme ceux d'un effet gravitationnel dû à des différences de densité entre la phase mobile et les solutés - ont amené à conduire ce type de chromatographie avec des billes de très petite taille et à moyenne ou haute pression. La chromatographie par exclusion de taille est une technique douce, où les molécules peuvent rester dans tout milieu de toute force ionique ou de tout pH, avec toute teneur en détergents ou agents chaotropes, ou toute solution appropriée au maintien de leur intégrité. Par exemple, les protéines séparées par ce moyen peuvent garder une stabilité fonctionnelle ou structurale, car la phase mobile peut accepter les ions et les co-facteurs qui vont favoriser celles-ci.

La chromatographie d'exclusion de taille en conditions dénaturantes ou non dénaturantes peut aussi aider, tout en minimisant l'emploi de détergents, à la caractérisation d'agrégats moléculaires où des protéines de membranes sont partie prenante (Cf. Löster K, Baum O, Hofman W, Reutter W.

Characterization of molecular aggregates of alpha1 beta1 integrin and other rat liver membrane proteins by combination of size exclusion chromatography and chemical cross-linking. Journal of Chromatography A, 1995, 711, 187-199.)

Parmi les techniques chromatographiques les plus utilisées sont celles qui reposent sur une adsorption différentielle de solutés contenus dans une phase mobile, liquide ou gazeuse, qui traverse un phase stationnaire solide. La sélectivité en chromatographie d'adsorption, comme dans d'autres techniques de chromatographie, repose sur un process complet pour chacun des solutés: entraînement par la phase mobile et interaction d'énergie spécifique avec la phase stationnaire. La polarité du soluté est intermédiaire entre celle de la phase mobile et celle de la phase stationnaire. Si la polarité du soluté est trop éloignée de celle de la phase mobile, il n'y a pas une solubilité suffisante du soluté dans la phase mobile pour empêcher une rétention irréversible sur la phase stationnaire. Si la polarité du soluté est trop éloignée de celle de la phase stationnaire, il n'y a pas d'interaction avec la phase stationnaire. Cette contradiction est partiellement résolue l'emploi de mélanges binaires ou ternaires avec des polarités variées et des process successifs avec différentes phases mobiles de forces éluantes croissantes, c'est à dire des phases mobiles où l'on fait varier la composition des mélanges binaires ou ternaires de solvants à polarité différente pendant la séparation. L'apparition d'un mélange binaire ou ternaire suppose que le micro-environnement de la phase stationnaire va être le siège de gradient de concentrations entre différents solvants, selon que leur polarité est plus ou moins éloignée de celle de ladite phase stationnaire, ce qui va pouvoir donner lieu à des phénomènes de chromatographie de partage.

Comme il vient d'être dit, un solvant est d'autant plus éluant que sa polarité se rapproche de celle du soluté, et finalement de celle de la phase stationnaire, puisque cette dernière est censée être proche de celle du soluté. Ainsi, dans l'état actuel de l'art, un système chromatographique peut difficilement être exhaustif: l'exhaustivité d'un système où la phase mobile peut contenir des solutés de polarité assez éloignées supposerait que la phase stationnaire ait une large gamme d'adsorption, c'est à dire qu'elle soit ou très polaire ou très apolaire, ce qui va rendre difficile respectivement l'adsorption de solutés apolaires ou très polaires.



A l'intérieur d'une échelle limitée de polarité des solutés, la sélectivité est d'autant meilleure qu'une faible variation de polarité du solvant entraîne un changement sélectif de l'équilibre d'adsorption de solutés de polarités voisines.

Pour un phase stationnaire donnée, il existe, en sus de faire varier la polarité de la phase mobile,

- 5 d'autres moyens pour augmenter la sélectivité du processus chromatographique: on peut amener un compétiteur dans l'adsorption des solutés comme par exemple un cation ou un anion, ou bien modifier sélectivement les propriétés des solutés, comme par exemple en faisant varier le pH ou la force ionique.

- 10 Un nouveau type de matrice cependant voit le jour, comportant une phase stationnaire dont les greffons sont constitués de polymères de molécules ayant un côté apolaire et un côté polaire, comme un copolymère macroporeux réalisé à partir d'un équilibre entre les deux monomères que sont le divinylbenzène, apolaire, et le N-vinylpyrrolidone, polaire.

- 15 La chromatographie par adsorption en phase normale repose sur l'adsorption différentielle des solutés sur une phase stationnaire solide et polaire, telle que notamment à base d'alumine mais surtout de silicates, ou de polymères hydrophiles, comme des gels d'agarose ou de dextran, la phase mobile étant, elle, apolaire.

- A partir d'agarose, on obtient des micro-billes par un procédé d'émulsion-gélification à chaud utilisant d'abord un solvant non miscible à l'eau, puis un stabilisant, ledit procédé se terminant par l'éviction du solvant par succion filtration. Les gels d'agarose peuvent être réticulés par des agents réticulants tels que l'épichlorohydrine, le 2,3 dibromopropanol ou le divinylsulfone. Selon le pourcentage en agarose, (2, 4, 6%) les gels commerciaux Sepharose ont respectivement les appellations 2B, 4B, 6B.

- Le Sepharose CL, plus stable thermiquement et chimiquement, est réticulé avec du 2,3 - dibromopropanol en fortes conditions alcalines, opération suivie hydrolyse alcaline de ses groupements sulfates en conditions très réductrices, de manière à le rendre non-ionique ou très faiblement ionique.

- Le Sephadex est un gel de dextran réticulé avec l'épichlorohydrine qui est stable en conditions alcalines, salines, faiblement acides, mais qui est hydrolysé en conditions acides ou oxydantes marquées. Les gels Sephadex (LH-20) et (LH-60) peuvent être greffés avec des groupements hydroxypropyl qui se lient par des liaisons éthers aux unités glucose des chaînes de dextrans, avec pour effet de moduler leur polarité

- La silice est insoluble dans l'eau pour un pH variant de 2 à 8. Sa polarité est apportée par la présence à sa surface de groupements silanols ( $\text{SiOH}$ ), au nombre de 4,6 par  $\text{nm}^2$ , dont le groupement OH est polaire et donneur de protons dans des liaisons hydrogène. Un groupement silanol peut rester libre (silanol libre), ou bien engager une liaison hydrogène avec un groupement silanol voisin (silanol lié), ou encore engager une liaison hydrogène avec une molécule d'eau. Le groupement OH d'un silanol libre peut aussi être donneur de protons à une molécule d'eau (silanol libre hydraté par une couche d'eau monomoléculaire), ou à une autre molécule polaire. Par ailleurs, des silanols liés peuvent attirer des molécules d'eau : on alors des silanols hydratés par une couche d'eau pluri-moléculaire, ce sont des gels de silice fortement hydratés. Les gels de silice sont très poreux. Selon que leur surface spécifique est plus ou moins grande (elle varie de 200 à 600  $\text{m}^2$  par gramme), il comportent des pores d'un plus ou moins grand diamètre et par suite un masquage plus ou moins grand des silanols libres. Les groupements silanols libres sont des sites d'adsorption "forts", totalement disponibles pour une liaison

hydrogène. Les groupements silanols libres hydratés et les groupements silanols liés sont encore des sites d'adsorption. Par contre, les groupements silanols hydratés par une couche d'eau pluri-moléculaire sont plutôt des sites de chromatographie de partage. Dans les gels de silice fortement hydratés dont la surface spécifique dépasse 550 m<sup>2</sup> par gramme et dont la teneur en eau dépasse 5%,  
 5 on considère que la chromatographie de partage devient prépondérante par rapport à la chromatographie d'adsorption. Les gels de silice commercialisés ont une granulométrie variée et mentionnent le nombre de silanols restés libres par unité de surface (par exemple le Lichosorb Si 100 comporte 2,95 groupements silanols libres par nm<sup>2</sup> pour une surface spécifique de 309 m<sup>2</sup> par gramme, tandis que le Lichosorb Si 80 en comporte 2,20 pour une surface spécifique de 482 m<sup>2</sup> par gramme).

10

En chromatographie d'adsorption, on cherche à garder constant le pouvoir d'adsorption de l'absorbant, et ce quelle que soit la phase mobile. Pour ce faire, on ajuste la teneur en eau d'un solvant à un niveau dit de "teneur en eau isoactivante" pour que l'énergie d'adsorption de l'adsorbant soit équivalente à ce qu'elle peut avoir avec un solvant de référence ayant lui une teneur en eau donnée (par exemple, le  
 15 solvant de référence pourra être l'acétate d'éthyle à 0,06% d'eau lorsqu'on veut une référence pour le pouvoir absorbant d'une silice d'une surface spécifique de 550 m<sup>2</sup> par gramme.)

La polarité des silices peut être modulée par greffage. Les greffons polaires peuvent être du type aminopropyle, paranitrobenzyle, alkylnitrile(nitro), glycéropropyle (diol). Les greffages se font par  
 20 silanisation, c'est à dire par réactivité d'alkoxysilanes ou chlorosilanes mono, di- ou tri fonctionnels. Pour que cette réaction puisse avoir lieu, il faut que les molécules de silanes pénètrent dans les pores de la silice, ce qui suppose un diamètre de pores supérieur à 10 nm. De plus, une molécule de silane pouvant occuper deux fois la surface d'une molécule de silanol (0,4 nm<sup>2</sup> contre 0,2 nm<sup>2</sup>), le rendement maximal de greffage est de 50%, c'est à dire 4 micromoles/nm<sup>2</sup>. Dans la pratique, les phases  
 25 commerciales greffées non polymérisées ont un taux de greffage de 3,5 à 3,7 micromoles par nm<sup>2</sup>. Dans une réaction de silanisation avec des chlorosilanes trifonctionnels, seuls deux atomes de chlore peuvent réagir pour des raisons stériques, la liaison Si-Cl avec le troisième atome de chlore dudit silane tri-fonctionnel pouvant être hydrolysée par des traces d'eau, et la liaison Si-OH obtenue donnant  
 30 lieu à une nouvelle réaction avec des silanes résiduels contenus dans le milieu réactionnel et conduisant à une réaction en chaîne de polymérisation. Les phases stationnaires polymérisées ont alors une grande capacité, mais une résistance importante au transfert de masse.

A l'inverse, la chromatographie par adsorption en phase inversée repose sur l'adsorption différentielle des solutés sur une phase stationnaire solide et apolaire, telle que notamment des silices greffées avec  
 35 des groupements apolaires, la phase mobile étant, elle, plus ou moins polaire, selon par exemple des proportions variées de solvants plus ou moins polaires, par exemple d'eau et de méthanol ou bien encore d'eau et d'acétonitrile.

Si certaines matrices telles que copolymère styrène-divinylbenzène ou pyrocarbone peuvent être apolaires "ex-abrupto", les groupements fonctionnels apolaires greffés sur les phases stationnaires telles  
 40 que silice ou Sepharose peuvent être des groupements alkyles C18 ou C8 ou C4, ou des groupements phényl. La procédure de greffage des silices greffées avec des groupements apolaires s'obtient par silanisation, tout comme la procédure de greffage des silices greffées avec des groupements polaires. Il faut noter, comme dans le cas de silices vierges (polaires) ou des silices greffées polaires, la présence

de silanols résiduels provenant de l'hydrolyse des groupements réactifs de silanes trifonctionnels n'ayant pas réagi au cours de la synthèse. Ces silanols résiduels sont recouverts par des molécules d'eau et ceux qui sont accessibles créent un environnement propice à une chromatographie de partage sur phases stationnaires polaires: d'une part les molécules de solvant organique d'un mélange (eau-solvant organique) se fixent préférentiellement à la surface des greffons apolaires, d'autre part les molécules de soluté interagissent avec la phase liquide stationnaire. Le mécanisme d'interaction est soit un mécanisme de partage des solutés entre la phase mobile et la phase liquide adsorbée, soit basé sur une interaction hydrophobe entre les molécules de soluté et la phase stationnaire apolaire. De plus, si leur polarité est suffisante, les molécules de soluté peuvent déplacer des molécules de la phase liquide polaire stationnaire.

Les groupements silanols résiduels accessibles peuvent être éliminés (c'est le process appelé "end-capping") par un traitement au triméthylchlorosilane (TMCS).

Il existe d'autres matrices apolaires que les silices greffées avec des groupements alkyles C18 ou C8 ou C4 ou phényl. Par exemple, les Phenyl et Octyl-Sepharose, utilisés aussi en chromatographie d'interactions hydrophobes, sont obtenus lorsqu'on couple la réticulation du Sepharose CL avec une dérivation avec des groupements phenyl ou octyl.

Les matrices copolymère styrène-divinylbenzène ou pyrocarbone présentent l'avantage sur les silices greffées d'être stables dans une fourchette de pH beaucoup plus larges (1 à 13) contre (2 à 7,5), car la silice est attaquable par les ions OH. Ce défaut des silices a cependant été résolu par un revêtement siliconé sur la surface des pores qu'on trouve dans des phases stationnaires commerciales comme Capcell Pak.

Il faut aussi, dans ces comparaisons entre phases stationnaires, signaler qu'on peut désormais améliorer ce qui était le point faible des matrices copolymères, à savoir la résistance mécanique, en considérant les matrices copolymères macroporeuses. Celles-ci comportent à la fois une partie très fortement réticulée, imperméable aux solvants, une partie peu réticulée propice aux échanges entre la phase stationnaire et la phase mobile, et des macro-pores, sans présence de polymères. Cependant, d'autres phases stationnaires comme l'oxyde de zirconium poreux, ou le graphite poreux offrent naturellement les qualités de stabilité (pH de 1 à 14) et de résistance mécanique.

Une autre caractéristique des matrices copolymères précédentes est la présence de groupements aromatiques, susceptibles d'interagir dans la formation de complexes donneurs-accepteurs d'électrons avec les solutés. Il existe d'autres matrices copolymères, telles que par exemple celles à base d'alcool vinylique ou de polyméthylméthacrylates.

La chromatographie sur résines échangeuses d'ions permet de séparer des solutés ioniques suivant leur attraction électrostatique à la phase stationnaire, laquelle comporte une matrice à laquelle sont greffés des groupements fonctionnels fixes, ionisés, et capables de fixer des contre-ions. Les micro-particules de la phase stationnaire ionisée accueillent en leur sein les ions de charge opposée, et en excluent les ions de même charge. Les matrices de la phase stationnaire peuvent être des silices greffées ou des matrices copolymères. Par leur rôle d'exclusion, ainsi que par leur composition propre, comme par exemple la présence de noyaux aromatiques dans les matrices copolymères polystyrène divinyl benzène donnant lieu à des interactions par électrons pi, les matrices apportent une contribution au process qui se rajoute à celles de leurs groupements fonctionnels ionisés. Une compétition pour la liaison à la phase stationnaire s'établit entre les ions solutés de la phase mobile et des contre-ions

libérables par ladite phase stationnaire et donc échangeables. La phase mobile est une solution tampon dont le pH permet de contrôler les attractions électrostatiques des solutés, dans la mesure où à une certaine valeur du pH va correspondre une certaine charge des solutés. Par exemple les acides aminés des protéines, selon le pH, peuvent être présents dans la solution sous forme de molécules

- 5 zwitterioniques ou sous forme d'anions ou sous forme de cations. De plus, les matrices greffées sont poreuses (il s'agit de micro-particules de silice poreuse ou de copolymères organiques de structure micro-poreuse ou macro-poreuse de type poly(styrène/divinylbenzène) ou polyacrylate), ce qui donne lieu en même temps à un mécanisme de séparation non-ionique, par exemple des mécanismes de partage de molécules avec une polarité donnée. Par exemple, des solutés non ioniques ne subissent pas  
10 de répulsion électrostatique pour pénétrer à l'intérieur des pores de la matrice. Ce faisant, ils sont soumis à un mécanisme de partage gouverné par des interactions hydrophobes et/ou des interactions par transfert de charges .

- Une matrice peut être échangeur de cations ou échangeur d'anions, faible ou fort. Les échangeurs de cations forts (SCX pour Strong Cation Exchangers), du type acides forts, peuvent être sulfoniques, c'est à dire greffés avec des groupements fonctionnels sulfonates  $\text{SO}_3^-$  . Les échangeurs de cations  
15 faibles, du type acides faibles, peuvent être carboxyliques, c'est à dire greffés avec des groupements fonctionnels carboxylates  $\text{CO}_2^-$ . Les échangeurs d'anions forts (SAX pour Strong Anion Exchangers), du type bases fortes, peuvent être des ammonium quaternaires, c'est à dire greffés avec des groupements fonctionnels  $\text{NR}_3^+$ , tels que par exemple triméthylammonium . Les échangeurs d'anions  
20 faibles, du type bases faibles, peuvent être des ammonium non quaternaires , c'est à dire greffés avec des formes protonées d'amines primaire, secondaire ou tertiaire (groupements fonctionnels  $\text{NHR}_2^+$ , tels que par exemple diéthylaminoéthylammonium).

- Les abréviations du langage courant concernent, pour des échangeurs de cations, le CM, faiblement acide, pour Carboxymethyl, ainsi que SP et S, fortement acides, pour respectivement Sulphopropyl et methylSulfonate.  
25

- Egalement, les abréviations du langage courant concernent, pour des échangeurs d'anions, le DMAE et DEAE, faiblement basiques, pour respectivement Diméthylaminoethyl et Diéthylaminoethyl, ainsi que TMA, Q, et QAE, fortement basiques, pour respectivement Triméthylaminoethyl, Quaternary Ammonium, Quaternary aminoethyl.  
30

- La force éluante dépend en partie de la nature de l'ion développeur véhiculé par la phase mobile.

- Dans un premier mode de la chromatographie de paires d'ions ou chromatographie d'interactions d'ions, on tire profit de la présence dans la phase mobile d'ions avec une charge opposée à celle du soluté. En présence de soluté, dans une phase mobile à faible constante diélectrique, chaque contre-ion  
35 peut former une paire avec une molécule de soluté de charge opposée par attraction électrostatique coulombienne.

- Dans un deuxième mode de la chromatographie de paires d'ions ou chromatographie d'interactions d'ions, on tire profit de la présence dans la phase mobile d'ions de grande taille (on les appelle les contre-ions) comportant une partie apolaire et une charge opposée à celle du soluté. L'électro-  
40 neutralité est assurée par la présence de co-ions de même signe que les ions du soluté. Dans une phase mobile à forte polarité comme l'eau, en présence de soluté, chaque contre-ion peut former une paire avec une molécule de soluté par interaction hydrophobe. Si l'on utilise une phase stationnaire apolaire, telle qu'une silice greffée avec des groupements alkyles, le contre-ion peut s'adsorber sur les greffons

apolaires de la phase stationnaire, tout en devant laisser libres 60 à 70% d'entre eux. En effet, eux-mêmes se repoussent l'un l'autre par répulsion coulombienne entre ions de même charge lorsqu'ils se lient à des chaînes alkyles trop proches. Par ailleurs, tout en se liant à la phase stationnaire par leur partie apolaire, les contre-ions vont attirer au niveau de leur partie ionique des ions de charge opposée, comme les co-ions assurant l'électro-neutralité. Il s'opère un échange entre l'ion soluté et le co-ion qui sont de même charge. La capacité de rétention du soluté par la phase stationnaire dépendra, toutes choses égales, de la concentration en contre-ions. Si les ions du soluté sont suffisamment hydrophobes, on peut alors assister aussi au partage de paires d'ions (soluté/contre-ion) se fixant sur les groupements alkyles restés libres de la phase stationnaire et la solubilisation de ces mêmes ions (soluté et contre-ion) dans la phase mobile.

La rétention des solutés dépend de leur degré d'ionisation, de la teneur en solvant organique, et de la concentration en contre-ions dans la phase mobile.

Lorsque les solutés sont capables de former des complexes avec un cation ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ) ou un complexe donneur ou accepteur, on peut procéder respectivement à la chromatographie par échange de ligands, et à la chromatographie avec transferts de charges.

Dans la chromatographie par échange de ligands en mode statique, le cation métallique, par exemple le cuivre, est fixé dans la phase stationnaire, par exemple une silice vierge, par des liaisons ioniques ou covalentes, ce qui donne lieu au "cuivrage" desdites phases stationnaires. Ainsi, une liaison covalente du cuivre avec la silice est obtenue en présence d'ammoniaque, donnant lieu à des silices recouvertes de silicates de cupri-diamines. Ces silicates de cupri-diamines fixés à la phase stationnaire sont capables d'échanger l'ammoniaque avec un soluté donneur de doublets, qui devient le nouveau ligand en formant une liaison avec le cuivre de la phase stationnaire. Dans le même temps, les silicates de cupri-diamines peuvent solvater des molécules d'eau, ce qui les rend très hydrophiles. La rétention d'un soluté va dépendre de son caractère donneur (caractère complexant) et de son caractère hydrophile, ainsi que de la teneur en ammoniaque de la phase mobile, généralement un mélange ternaire eau-acétonitrile-ammoniaque dont la teneur en eau ne dépasse pas 50% afin de préserver la stabilité de la phase stationnaire.

Par contre, dans la chromatographie par échange de ligands en mode dynamique, la phase mobile contient un complexe d'un métal de transition avec un ligand comportant une chaîne hydrophobe, et la phase stationnaire, par exemple une silice greffée avec des groupements apolaires, tels que des groupements alkyle C18, est capable de fixer ce complexe hydrophobe. Dans la phase mobile, le métal de transition est en excès par rapport au ligand hydrophobe, de manière à être libre de pouvoir aussi conserver des sites de liaison faibles avec des molécules de solvant. Lorsque des solutés sont capables de former des complexes avec le métal de transition, ils se partagent entre des liaisons avec le métal dans la phase mobile et des liaisons avec le métal engagé dans des complexes avec le ligand hydrophobe, lui-même adsorbé sur la phase stationnaire hydrophobe.

Dans la chromatographie avec transferts de charges, il y a compétition entre les solutés et le solvant pour donner (ou accepter) des électrons à (ou de) des greffons de la phase stationnaire respectivement accepteurs ou donneurs d'électrons et former les complexes correspondants. Lesdits complexes correspondants formés avec les greffons sont très spécifiques, car un greffon peut être ou non accepteur ou donneur selon un deuxième composé en présence potentiellement accepteur ou donneur.

- Ces complexes ont une enthalpie de formation très faible, de quelques kilojoules. Ainsi, des silices greffées avec des greffons tels que composés aromatiques peuvent donner des électrons à un soluté particulier ou un solvant particulier accepteurs d'électrons et former des complexes. Ce solvant particulier est appelé le "modificateur polaire" de la phase mobile. Dans un tel système, les molécules de solvant peuvent aussi solvater les greffons de la phase stationnaire. En conséquence, il peut y avoir, pour recevoir des électrons de la phase stationnaire, une compétition à deux (soluté, modificateur polaire) avec un biais qui est que le soluté peut interagir aussi avec les greffons solvatés par le modificateur polaire. Finalement, il y a compétition entre les solutés et le modificateur polaire pour donner (ou accepter) des électrons à (ou de) des greffons libres, non solvatés, de la phase stationnaire.
- La rétention des solutés est d'autant plus forte que le nombre de greffons libres de la phase stationnaire est élevé, et le nombre de noyaux aromatiques par greffon et la densité spatiale de ces noyaux sont élevés. Toutes choses égales, la compétition pour la liaison à la phase stationnaire va se jouer sur la teneur en modificateur polaire de la phase mobile.
- Les principes précédemment évoqués sont compliqués dans le cas de molécules comme des peptides ou des protéines, qui sont des polymères d'acides aminés possédant chacun leur polarité, qui possèdent aussi leur charge nette globale pour un pH donné, et qui possèdent enfin une conformation spatiale qui dépend de la polarité du solvant. La conformation spatiale s'organise de telle sorte que les groupements fonctionnels de même polarité que celle du solvant soient exposés en surface de la molécule, tandis que les groupements fonctionnels de polarité opposée sont repoussés à l'intérieur de la molécule. Une autre possibilité est que les molécules de solvant s'auto-organisent (c'est le phénomène de solvation) autour des groupements fonctionnels du soluté de polarité opposée, créant une sorte de poche de masquage. Cette dernière a pour effet de masquer la polarité desdits groupements fonctionnels du soluté de polarité opposée à celle du solvant.
- En milieux aqueux, l'hydrophilicité d'une protéine ou d'un peptide dépend de sa composition en acides aminés. Lorsqu'à l'intérieur d'une séquence, la proportion d'acides aminés hydrophiles ou polaires est forte, les acides aminés hydrophobes ou apolaires (isoleucine, valine, leucine, phenylalanine) sont repoussés à l'intérieur de la molécule. Par contre, lorsqu'à l'intérieur d'une séquence, la proportion d'acides aminés apolaires ou hydrophobes est forte, il y a une interaction plus directe entre certains acides aminés hydrophobes et le milieu aqueux.

- Ainsi, un premier moyen d'augmenter la sélectivité est d'utiliser des changements de composition de mélanges binaires ou ternaires de solvants de différentes polarités pour obtenir une variation de polarité de la phase mobile, afin de complètement modifier la conformation spatiale du peptide ou de la protéine. On a alors des conformations spatiales de peptides ou de protéines spécifiques de la nouvelle polarité obtenue, d'autant plus éloignées de la configuration initiale (dénaturées) que la nouvelle polarité du solvant binaire ou ternaire est éloignée de sa polarité initiale. En partant d'un solvant tel qu'un mélange d'eau et d'acétonitrile, qui a pour effet de repousser vers l'intérieur de la molécule les groupements des acides aminés hydrophobes ou apolaires d'une protéine ou d'un peptide ayant une forte proportion d'acides aminés hydrophiles ou polaires, l'addition d'un solvant moins polaire va modifier la conformation de la protéine ou du peptide jusqu'à exposer les groupements fonctionnels moins polaires ou non polaires. Les peptides ou les protéines sont alors adsorbées sur une phase stationnaire greffée avec des groupements apolaires, tels que des groupements alkyles C18, C8

ou C4. Les protéines ou les peptides comportant le plus d'acides aminés avec des groupements fonctionnels apolaires seront les plus retardées.

Un second moyen d'augmenter la sélectivité est d'utiliser des variateurs de solvation des groupements fonctionnels, tels que des sels. A faible force ionique, les groupements fonctionnels hydrophobes ou apolaires sont entourés de molécules d'eau qui s'auto-organisent. Par contre, une forte force ionique démasque les groupements fonctionnels hydrophobes ou apolaires, en désorganisant les molécules d'eau qui les entourent. La chromatographie d'interactions hydrophobes consiste à partir d'une forte force ionique puis à la diminuer jusqu'à ce que les groupements fonctionnels hydrophobes ou apolaires des peptides ou protéines retrouvent leur masque en milieu aqueux de faible force ionique. Si l'on utilise une phase stationnaire apolaire, tels que greffées avec des groupements alkyles C18, C8 ou C4, ou phenyl, les protéines qui ont le plus de groupements fonctionnels hydrophobes sont celles qui sont le plus retardées. Pour ce type de chromatographie, on utilise souvent les Phenyl et Octyl-Sepharose.

Plusieurs modèles ont tenté de décrire les lois de séparation en chromatographie, en particulier en s'attachant à paramétrer la hauteur de plateau théorique dans la micro-colonne.

Différents modèles (Van Deemter, Giddings, Huber, Knox, Horvath) renvoient à différentes équations pour calculer la hauteur de plateau théorique H.

Par exemple, l'équation de Van Deemter est de la forme:

$$H = A/d + B/d + C$$

A est un terme qui rend compte de la diffusion axiale,

B est un terme qui rend compte des transferts de masse incomplets entre phase mobile et phase stationnaire,

C est un terme qui rend compte d'une part de trajets de longueur inégale pour traverser la colonne, d'autre part de la difficulté pour la phase mobile et les solutés d'accéder aux mailles formées par la phase stationnaire: il est optimal que la phase mobile et les solutés atteignent lesdites mailles par convection plutôt que par diffusion.

d est le débit de la phase mobile au travers de la colonne.

Tous les modèles rendent compte, entre autres, du fait que la diffusion axiale, un phénomène qui est d'autant plus marqué que les molécules sont petites et qui contrecarre la finesse de résolution des séparations, est d'autant plus limitée que la vitesse de la phase mobile est grande, mais que dans le même temps le transfert de masse entre les phases stationnaire et mobile est d'autant mieux effectué que la vitesse de la phase mobile est faible. Excepté pour la chromatographie par exclusion de taille, ils rendent aussi compte du fait que la qualité des séparations est d'autant meilleure que l'accès par convection de la phase mobile aux mailles formées par la phase stationnaire l'emporte sur l'accès par diffusion, c'est à dire que le diamètre des particules de la phase stationnaire est faible.

L'électrochromatographie est une électrophorèse effectuée dans un capillaire qui contient une phase stationnaire et qui est soumis à ses deux extrémités à un champ électrique (Cf. Manz A, Effenhauser CS, Burggraf, Harrison DJ, Seiler K, Fluri K. Electroosmotic pumping and electrophoretic separations

- for miniaturized chemical analysis systems. J. Micromech. Microeng, 1994, 4, 257-265 ; Jacobson SC, Kutter JP, Culbertson CT, Ramsey JM. Rapid electrophoretic and chromatographic analysis on microchips). Les solutés sont séparés à la fois selon leur mobilité électrophorétique et selon leur coefficient de distribution entre phase mobile et phase stationnaire (Cf. Altria KD. Overview of capillary electrophoresis and electrochromatography, Journal of Chromatography A, 1999, 856, 443-463; Quirino JP, Terabe S. Electrokinetic chromatography, Journal of Chromatography A, 1999, 465-482 ; Smith NW, Carter-Finch AS, Electrochromatography, Journal of Chromatography A, 2000, 892, 219-255 ; Bartle KD, Carney RA, Cavazza A, Cikalo MG, Myers P, Robson MM, Roulin SCP, Sealey K. Capillary electrochromatography on silica columns : factors influencing performance. Journal of Chromatography A, 2000, 892, 279-299; Pyell U. Advances in column technology and instrumentation in capillary electrochromatography, Journal of Chromatography A, 2000, 892, 257-278; Angus PDA, Demarest CW, Catalano T, Stobaugh JF. Aspects of column fabrication for packed capillary electrochromatography. Journal of Chromatography A, 887, 2000, 347-345; Rapp E, Bayer E. Improved column preparation and performance in capillary electrochromatography. Journal of Chromatography A, 2000, 887, 367-378; Luedtke S, Adam Th, von Doehren N, Unger KK. Towards the ultimate minimum particle diameter of silica packings in capillary electrochromatography, Journal of Chromatography A, 2000, 887, 339-346 ; Liu CH, Stationary phases for capillary electrophoresis and capillary electrochromatography. Electrophoresis 2001, 22, 612-628 ; Hayes JD, Malik A. Sol-gel open tubular ODS columns with reversed electroosmotic flow for capillary electrochromatography. Anal. Chem. 2001, 73, 987-996; Roed L, Lundanes E, Greibrokk T. Non-aqueous electrochromatography on continuous bed columns of sol-gel bonded large-pore C30 material: separation of retinyl esters. J. Microcolumns Separations. 2000. 12(11). 561-567.).
- Il est possible d'appliquer le champ électrique de manière externe aux canaux sur leur longueur (Hayes MA. Extension of external voltage control of electro-osmosis to high pH buffers. Anal Chem, 1999, 71, 3793-3798).
- L'électrochromatographie micellaire sur supports miniaturisés a été décrite (Cf. Culbertson CT, Jacobson SC, Ramsey JR. Micro-chip device for high efficiency separations. Anal. Chem, 2000, 72, 5814-5819).
- Les gradients d'élution peuvent être des micro-gradients d'élution ( Cf. Que AH, Kahle V, Novotny MV. A micro-gradient elution system for capillary electrochromatography. J. Microcolumn separations, 2000, 12(1), , 1-5.)

#### ETAT DE L'ART DANS LA SEPARATION DES PEPTIDES ET PROTEINES:

- La séparation des peptides ou des protéines peut s'effectuer par des techniques de chromatographie ou d'électrochromatographie ou de micro-électrophorèse, très souvent couplées à la spectrométrie de masse.
- Le recueil « Protein Liquid Chromatography. Journal of Chromatography Library, 2000, vol 61, ed. M. Kastner, Elsevier) décrit la séparation des peptides ou protéines, sous la forme d'articles passant en revue leur séparation par chromatographie en phase inversée (Schlüter H. Reversed-Phase Chromatography, p 147-223), par chromatographie par échange d'ions (Roos P. Ion Exchange Chromatography. p 3-88), par chromatographie par interactions hydrophobes (Jacob LR .



- Hydrophobic Interaction Chromatography. p 235-267), par chromatographie sur hydroxyapatite (Deppert WR, Lukacin R, Hydroxyapatite chromatography, p 271-297), par chromatographie d'affinité pour des ions métaux immobilisés (Kastner M, Immobilized Ion Affinity Chromatography, p 301-377), par chromato-focalisation (Lukacin R, Deppert WR, Chromatofocusing, p 385-413), par chromatographie d'affinité pour des ligands moléculaires (Kirchberger J., Böhme HJ, Dye-Affinity Chromatography, p 415-446), par chromatographie par déplacement (Schlüter H, Jankowski J, Displacement Chromatography, p 505-522), par chromatographie de partage liquide-liquide (Hansson UB, Wingren C. Liquid liquid partition chromatography, p 469-502), par chromatographie par liaison par les résidus cystéine (Whitney D. Covalent Chromatography, p 639-663).
- 10 La chromatographie en phase inversée de peptides et de protéines sur des silices non poreuses mono-dispersées de 1,5 micron a été décrite (Cf. Jilge G, Janzen R, Giesche H, Unger KK, Kinkel JN, Hearn MTW. Retention and selectivity of proteins and peptides in gradient elution of non-porous monodisperse 1,5 micron reversed phase silica. *Journal of Chromatography A*. 1987, 397, 71-80 ;
- 15 Jilge G, Janzen R, Giesche H, Unger KK, Kinkel JN, Hearn MTW. Mobile phase and surface mediated effects on recovery of native proteins in gradient elution on non-porous monodisperse 1,5 micron reversed phase silica. *Journal of Chromatography A*. 1987, 397, 80-89.)
- 20 La chromatographie de peptides et de protéines par échange d'anions sur une phase polymérique non poreuse mono-dispersée de 3 microns de poly(styrène-divinylbenzène) a été décrite (Cf. Regnier FE, Rounds MA. Synthesis of a non-porous, polystyrene-based anion-exchange packing material and its application to fast high-performance liquid chromatography of proteins. *Journal of Chromatography A*. 1988. 443. 73-83).
- 25 La chromatographie par interactions hydrophobes de peptides et de protéines sur des silices non poreuses mono-dispersées de 1,5 micron a été décrite dans (Cf. Jilge G, Janzen R, Giesche H, Unger KK, Kinkel JN, Hearn MTW. Performance of non-porous monodisperse 1,5 micron bonded silicas in the separation of proteins by hydrophobic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1987, 397, 91-97).
- 30 La chromatographie par affinité pour des ions cuivriques immobilisés sur des phases stationnaires Sepharose CL-4B grâce à une procédure de couplage epoxy et utilisant le ligand chélateur tridenté N-(2-pyridylmethyl) aminoacétate a été décrite pour la séparation de protéines aux pH 5, 7 et 9 (Cf. Chaouk H, Hearn MTW. New ligand, N-(2-pyridylmethyl)aminoacetate, for use in the immobilised metal ion affinity chromatographic separation of proteins. *Journal of Chromatography A*, 1999, 852,
- 35 105-115).
- 40 La rétention de peptides synthétiques ayant un nombre plus ou moins grand de résidus histidine en chromatographie par affinité pour des ions métalliques immobilisés sur des phases stationnaires Sepharose CL-4B et utilisant l'ion acide iminodiacétique comme ligand chélateur tridenté ou l'ion acide nitrilotriacétique comme ligand chélateur tétradenté a été rapporté (Cf Kronina VV, Wirth HJ, Hearn MTW. Characterization by immobilised metal ion affinity chromatographic procedures of the binding behaviour of several synthetic peptides designed to have high affinity for Cu(II) ions. *Journal of Chromatography A*, 1999, 852, 261-272.)

La chromatographie de peptides par chromatographie micellaire a été décrite (Cf. Kord AS, Khaledi MG. Selectivity of organic solvents in micellar liquid chromatography of amino-acids and peptides. *Journal of Chromatography A*. 1993. 631, 1255-132).

- 5 La détection est très souvent opérée par spectrométrie de masse (Cf. Dongré AR, Eng JK, Yates JR III. Emerging tandem-mass spectrometry techniques for the rapid identification of proteins. *TiBTECH*, 1997, 15, 418-425; Anderegg RJ, Wagner DS, Blackburn RK, Opiteck GJ, Jorgenson JW. A multidimensional approach to protein characterization. *Journal of Protein Chemistry*, 1997, 16, 5 ; Huang P, Jin X, Chen Y, Srinivasan JR, Lubman DM. Use of a mixed mode packing and voltage tuning for peptide mixture separation in pressurized capillary electrochromatography with an ion trap storage/reflectron Time-of-Flight mass spectrometer detector. *Anal. Chem*, 1999, 71, 1786-1791 ; Martin SE, Shabanowitz J, Hunt DF, Marto JA. Subfemtomole MS and MS/MS peptide sequence analysis using Nano-HPLC micro-ESI Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry; *Anal. Chem* 2000, 72, 4266-4274; Gatlin CL, Eng JK, Cross ST, Detter JC, Yates JR
- 10 III. Automated identification of amino-acid sequence variation in proteins by HPLC/Microspray tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem*, 2000, 72, 757-763; Ji J, Chakraborty A, geng M, Zhnag X, Amini A, Bina M, Regnier F. Strategy for qualitative and quantitative analysis in proteomics based on signature peptides. *Journal of Chromatography B*, 2000, 745, 197-210 ; Van Pelt CK, Corso TN, Schultz GA, Lowes S, Henion J. A four-column parallel chromatography system for isocratic or
- 15 gradient LC/MS analyses. *Anal. Chem*. 2001, 73, 582-5888; Patterson SD et al. Towards defining the urinary proteome using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Proteomics* 2001, 1, 93-107 et 2, 108-117).

- 25 Deux methodes de séparation chromatographiques peuvent être couplées en ligne avant la détection par spectrométrie de masse , ce qui est décrit par la notation abrégée LC-LC-MS (LC = liquid chromatography, MS = mass spectrometry). ( Cf. Link AJ, Eng J, Schieltz DM, Carmack E, Mize GJ, Morris DR, Garvik BM, Yates JR III. Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nature Biotechnology*, 1999, 17, 676-681; Washburn MP, Wolters D, Yates JR III. Large-scale analysis of the yeast proteome by multi-dimensional protein identification technology. *Nature*
- 30 *Biotechnology*. 2001, 19, 242-247; Davis MT, Beierle J, Bures ET, Mac Ginley MD, Mort J, Robinson JH, Saphr CS, YU W, Luethy R, Patterson SD. Automated LC-LC-MS-MS platform using binary ion-exchange and gradient reversed-phase chromatography for improved proteomic analyses. *Journal of Chromatography B*, 2001, 752, 281-291 ; Zhou H, Watts JD, Aebersold R. A systematic approach to the analysis of protein phosphorylation, 2001, 375-382).

- 35 La séparation des peptides et des protéines en capillaires ou sur supports miniaturisés avec micro-canaux ou micro-colonnes peut s'effectuer en techniques de micro-chromatographie ou micro-électrochromatographie ou de micro-électrophorèse, souvent couplées à la spectrométrie de masse (Cf. Xie S., Allington R.W., Svec F., Fréchet J. Rapid reverse-phase separation of proteins and
- 40 peptides using optimized moulded monolithic poly(styrene-co-divinylbenzene) columns; Josic D., Buchacher A., Jungbauer A. Monoliths as stationary phases for separation of proteins and polynucleotides and enzymatic conversion. *Journal of Chromatography B*, 2001, 752, 191-205; Walhagen K, Unger KK, Hearn MTW, Capillary electroosmotic chromatography of peptides,

- Journal of Chromatography A, 2000, 887, 165-185 ; Krull IS, Sebag A, Stevenson R, Specific applications of capillary electrochromatography to biopolymers, including proteins, nucleic acids, peptide mapping, antibodies, and so forth, Journal of chromatography A, 2000, 887, 137-136. ; He B, Ji J, Regnier FE. Capillary electrochromatography of peptides in a micro-fabricated system. Journal of Chromatography A, 1999, 853, 257-262) .

- Les séparations d'échantillons biologiques peuvent aussi s'effectuer par micro-électrophorèse avec une phase préalable d'enrichissement (Cf. Lichtenberg J, Verpoorte E, de Rooij N. Sample preconcentration by field amplification stacking for microchip-based capillary electrophoresis. Electrophoresis 2001, 22, 258-271; Wu XZ, Hosaka A, Hobo T. An on-line electrophoretic concentration method for capillary electrophoresis of proteins. Anal. Chem, 1998, 70, 2081-2084; Tragas C, Pawliszyn J. On-line coupling of high performance gel filtration chromatography with imaged capillary isoelectric focusing using a membrane interface. Electrophoresis 2000, 21, 227-237; Cappiello A, Berloni A, Famiglini G, Mangani F, Palma P. Micro-SPE method for sample introduction in capillary HPLC/MS. Anal. Chem 2001, 73, 298-302; Timperman AT, Aebersold R. Peptide electro-extraction for direct coupling of in-gel digests with capillary LC-MS/MS for protein identification and sequencing. Anal. Chem. 2000, 72, 4115-4121; Tong W, Link A, Eng JK, Yates JR III. Identification of proteins in complexes by solid-phase micro-extraction / multistep elution / capillary electrophoresis / tandem mass spectrometry. Anal Chem 1999, 71, 2270-2278; Figeys D, Ducret A, Yates JR III, Aebersold R. Protein identification by solid-phase micro extraction / multistep elution / capillary electrophoresis / tandem mass spectrometry. Nature Biotechnology, 1999, 14, 1579-1583; Stegehuis DS, Irth H, Tjaden UR, van der Greef J. Isochatophoresis as on-line concentration pretreatment technique in capillary electrophoresis. J. Chromat, 1991, 538(2), 393-402.; Polson NA, Savin DP, Hayes MA. Electrophoretic focusing preconcentration technique using a continuous buffer system for capillary electrophoresis. J. Microcolumn Separations, 2000, 12(2), 98-106.).

- Les séparations électrophorétiques par micro-électrophorèse d'échantillons biologiques peuvent s'effectuer sur des supports gravés ou moulés ou emboutis ( Cf. Liu Y, Foote RS, Culbertson CT, Jacobson SC, Ramsey RS, Ramsey JR. Electrophoretic separations on microchips. J. Microcolumn Separations, 2000, 12(7), 407-11; Alarie JP, Jacobson SC, Ramsey JM. Electrophoretic injection bias in a microchip valving scheme. Electrophoresis. 2001. Jan;22(2):312-7; Rocklin RD, Ramsey RS, Ramsey JM. A microfabricated fluidic device for performing two-dimensional liquid-phase separations. Anal Chem. 2000 Nov 1;72(21):5244-9; Liu Y, Foote RS, Jacobson SC, Ramsey RS, Ramsey JM. Electrophoretic separation of proteins on a microchip with noncovalent, postcolumn labeling. Anal Chem. 2000 Oct 1;72(19):4608-13; Khandurina J, McKnight TE, Jacobson SC, Waters LC, Foote RS, Ramsey JM. Integrated system for rapid PCR-based DNA analysis in microfluidic devices. Anal Chem. 2000 Jul 1;72(13):2995-3000; Alarie JP, Jacobson SC, Culbertson CT, Ramsey JM. Effects of the electric field distribution on microchip valving performance. Electrophoresis. 2000 Jan;21(1):100-6.; Khandurina J, Jacobson SC, Waters LC, Foote RS, Ramsey JM. Microfabricated porous membrane structure for sample concentration and electrophoretic analysis. Anal Chem. 1999 May 1;71(9):1815 ; Waters LC, Jacobson SC, Kroutchinina N, Khandurina J, Foote RS, Ramsey JM. Multiple sample PCR amplification and electrophoretic analysis on a microchip. Anal Chem. 1998 Dec 15;70(24):5172-6. ; Waters LC, Jacobson SC, Kroutchinina N, Khandurina J, Foote RS, Ramsey

- JM. Microchip device for cell lysis, multiplex PCR amplification, and electrophoretic sizing. *Anal Chem.* 1998 Jan 1;70(1):158-62 ; von Brocke A, Nicholson G, Bayer E. Recent advances in capillary electrophoresis/electrospray-mass spectrometry. *Electrophoresis.* 2001 Apr;22(7):1251-66; Schmid MG, Grobuschek N, Lecnik O, Gubitz G. Chiral ligand-exchange capillary electrophoresis. *J Biochem Biophys Methods.* 2001 Apr 24;48(2):143-54 ; Nishi H, Kuwahara Y. Enantiomer separation by capillary electrophoresis utilizing noncyclic mono-, oligo- and polysaccharides as chiral selectors. *J Biochem Biophys Methods.* 2001 Apr 24;48(2):89-102; Castellanos-Serra L, Hardy E. Detection of biomolecules in electrophoresis gels with salts of imidazole and zinc II: a decade of research. *Electrophoresis.* 2001 Mar;22(5):864-73; Colyer C. Noncovalent labeling of proteins in capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Cell Biochem Biophys.* 2000;33(3):323-37; Bonnell E, Waldron KC. On-line solid-phase preconcentration for sensitivity enhancement in capillary electrophoresis. *J Capillary Electrophor.* 1999 May-Aug;6(3-4):61-73; Horvath J, Dolnik V. Polymer wall coatings for capillary electrophoresis. *Electrophoresis.* 2001;22(4):644-55 ; Kricka LJ. Microchips, microarrays, biochips and nanochips: personal laboratories for the 21st century. *Clin Chim Acta.* 2001 May;307(1-2):219-23. Wang J, Chatrathi MP, Tian B ; Brahmasandra SN, Ugaz VM, Burke DT, Mastroangelo CH, Burns MA. Electrophoresis in microfabricated devices using photopolymerized polyacrylamide gels and electrode-defined sample injection. *Electrophoresis.* 2001 Jan;22(2):300-11; Dutta D, Leighton DT Jr. Dispersion reduction in pressure-driven flow through microetched channels. *Anal Chem.* 2001 Feb 1;73(3):504-13; Baldwin RP. Recent advances in electrochemical detection in capillary electrophoresis. *Electrophoresis.* 2000 Dec;21(18):4017-28 ; Bruin GJ. Recent developments in electrokinetically driven analysis on microfabricated devices. *Electrophoresis.* 2000 Dec;21(18):3931-51; Krishnan M, Namasivayam V, Lin R, Pal R, Burns MA. Microfabricated reaction and separation systems. *Curr Opin Biotechnol.* 2001 Feb;12(1):92-8; Hutt LD, Glavin DP, Bada JL, Mathies RA. Microfabricated capillary electrophoresis amino acid chirality analyzer for extraterrestrial exploration. *Anal Chem.* 1999 Sep 15;71(18):4000-6; Chiem NH, Harrison DJ. Microchip systems for immunoassay: an integrated immunoreactor with electrophoretic separation for serum theophylline determination. *Clin Chem.* 1998 Mar;44(3):591-8; Woolley AT, Lao K, Glazer AN, Mathies RA. Capillary electrophoresis chips with integrated electrochemical detection. *Anal Chem.* 1998 Feb 15;70(4):684-8; Colyer CL, Tang T, Chiem N, Harrison DJ. Clinical potential of microchip capillary electrophoresis systems. *Electrophoresis.* 1997 Sep;18(10):1733-41).

- Les séparations électrophorétiques peuvent utiliser la focalisation iso-électrique, c'est à dire un gradient de pH sur la longueur du micro-capillaire de séparation. Ce gradient peut être obtenu par un ensemble de petites molécules ampholytes chargées selon leur pI, telles que celles synthétisées à base d'acide acrylique et de polyamines ou obtenues par couplage par épichlorhydrine . Avec cette méthode, le gradient de pH peut aller de 3 à 10. Ledit gradient peut aussi être obtenu par greffage, dans un gel de polyacrylamide, de monomères d'acrylamide modifiés portant des groupements chimiques ionisables de PK acides ou basiques. Avec cette méthode, le gradient de pH peut aller de 1 à 12,5 (Cf Kawano Y, Ito Y, Yamakawa Y, Yamashino T, Horii T, Hasegawa T, Ohta M. Rapid isolation and identification of staphylococcal exoproteins by reverse phase capillary high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *FEMS Microbiol Lett.* 2000 Aug 1;189(1):103-8 ; Bean SR, Lookhart GL. Electrophoresis of cereal storage proteins. *J Chromatogr A.* 2000 Jun 9;881(1-2):23-36 ; Issaq HJ. A decade of capillary electrophoresis. *Electrophoresis.* 2000

- Jun;21(10):1921-39 ; Herrero-Martinez JM, Simo-Alfonso EF, Ramis-Ramos G, Gelfi C, Righetti PG. Determination of cow's milk in non-bovine and mixed cheeses by capillary electrophoresis of whey proteins in acidic isoelectric buffers. *J Chromatogr A*. 2000 May 12;878(2):261-71; Jensen PK, Pasa-Tolic L, Peden KK, Martinovic S, Lipton MS, Anderson GA, Tolic N, Wong KK, Smith RD.
- 5 Mass spectrometric detection for capillary isoelectric focusing separations of complex protein mixtures. *Electrophoresis*. 2000 Apr;21(7):1372-80; Shen Y, Berger SJ, Anderson GA, Smith RD. High-efficiency capillary isoelectric focusing of peptides. *Anal Chem*. 2000 May 1;72(9):2154-9; Shimura K, Zhi W, Matsumoto H, Kasai K. Accuracy in the determination of isoelectric points of some proteins and a peptide by capillary isoelectric focusing: utility of synthetic peptides as isoelectric
- 10 point markers. *Anal Chem*. 2000 Oct 1;72(19):4747-57 ; Yang L, Lee CS, Hofstadler SA, Pasa-Tolic L, Smith RD. Capillary isoelectric focusing-electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for protein characterization. *Anal Chem*. 1998 Aug 1;70(15):3235-41; Chartogne A, Tjaden UR, Van der Greef J. A free-flow electrophoresis chip device for interfacing . capillary isoelectric focusing on-line with electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun Mass*
- 15 *Spectrom*. 2000;14(14):1269-74 ; Wen J, Lin Y, Xiang F, Matson DW, Udseth HR, Smith RD. Microfabricated isoelectric focusing device for direct electrospray ionization-mass spectrometry. *Electrophoresis*. 2000 Jan;21(1):191 ; Rossier JS, Schwarz A, Reymond F, Ferrigno R, Bianchi F, Girault HH. Microchannel networks for electrophoretic separations. *Electrophoresis*. 1999 Apr-May;20(4-5):727-31; Hofmann O, Che D, Cruickshank KA, Muller UR. Adaptation of capillary
- 20 isoelectric focusing to microchannels on a glass chip. *Anal Chem*. 1999 Feb 1;71(3):678-86; Horka M, Willmann T, Blum M, Nording P, Friedl Z, Slais K. Capillary isoelectric focusing with UV-induced fluorescence detection. *J Chromatogr A*. 2001 May 4;916(1-2):65-71; Hu JP, Lanthier P, White TC, McHugh SG, Yaguchi M, Roy R, Thibault P. Characterization of cellobiohydrolase I (Cel7A) glycoforms from extracts of *Trichoderma reesei* using capillary isoelectric focusing and
- 25 electrospray mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 2001 Mar 10;752(2):349-68; Shihabi ZK. Stacking in capillary zone electrophoresis. *J Chromatogr A*. 2000 Dec 1;902(1):107-17; Gubitz G, Schmid MG. Recent progress in chiral separation principles in capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 2000 Dec;21(18):4112-35; Mao Q, Pawliszyn J, Thormann W. Dynamics of capillary isoelectric focusing in the absence of fluid flow: high-resolution computer simulation and
- 30 experimental validation with whole column optical imaging. *Anal Chem*. 2000 Nov 1;72(21):5493-502 ; Martinovic S, Berger SJ, Pasa-Tolic L, Smith RD. Separation and detection of intact noncovalent protein complexes from mixtures by on-line capillary isoelectric focusing-mass spectrometry. *Anal Chem*. 2000 Nov 1;72(21):5356-60; Huang T, Wu XZ, Pawliszyn J. Capillary isoelectric focusing without carrier ampholytes. *Anal Chem*. 2000 Oct 1;72(19):4758-61; Barkemeyer
- 35 BM, Hempe JM. Effect of transfusion on hemoglobin variants in preterm infants. *J Perinatol*. 2000 Sep;20(6):355-8 ; Sugano M, Hidaka H, Yamauchi K, Nakabayashi T, Higuchi Y, Fujita K, Okumura N, Ushiyama Y, Tozuka M, Katsuyama T. Analysis of hemoglobin and globin chain variants by a commonly used capillary isoelectric focusing method. *Electrophoresis*. 2000 Aug;21(14):3016-9 ; Lupi A, Viglio S, Luisetti M, Gorrini M, Coni P, Faa G, Cetta G, Iadarola P. Alpha1-antitrypsin in
- 40 serum determined by capillary isoelectric focusing. *Electrophoresis*. 2000 Sep;21(15):3318-26 ; Martinovic S, Pasa-Tolic, Masselon C, Jensen PK, Stone CL, Smith RD. Characterization of human alcohol dehydrogenase isoenzymes by capillary isoelectric focusing-mass spectrometry. *Electrophoresis*. 2000 Jul;21(12):2368-75 ; Chartogne A, Tjaden UR, Van der Greef J. A free-flow

electrophoresis chip device for interfacing capillary isoelectric focusing on-line with electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2000;14(14):1269-74).

- Les séparations électrophorétiques peuvent enfin utiliser l'isochatophorèse, c'est à dire une électroséparation avec gradient de champ électrique (Cf. Chen S, Lee ML. Automated instrumentation for comprehensive isotachopheresis-capillary zone electrophoresis. *Anal Chem.* 2000 Feb 15;72(4):816-20)
- 10 ETAT DE L'ART DANS LES TECHNIQUES DE SPECTROMETRIE DE MASSE ET LES TECHNIQUES DE LEUR INTERFACAGE AVEC LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE:
- Les techniques de spectrométrie de masse utilisent l'ionisation en nébulisation, comme par exemple la spectrométrie de masse en tandem avec ionisation en electrospray (ESI-MS, ou Electrospray
- 15 Ionisation Mass Spectrometry) ou en désorption, comme par exemple la désorption sur matrice et assistée par laser dans la spectrométrie de masse MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization).
- Dans la spectrométrie de masse par triple quadrupole, ou par piège à ions (Ion Trap) ou en tandem avec ionisation en electrospray (ESI-MS-MS, ou ou Electrospray Ionisation Tandem Mass
- 20 Spectrometry), on peut tirer profit de la dissociation par collision (CID, ou Collision Induced Dissociation): chaque peptide est susceptible de posséder un spectre de masse de dissociation par collision archivé dans les banques de données (Cf. Figeys D, Ning Y, Aebersold R. A microfabricated device for rapid protein identification by microelectrospray Ion Trap mass Spectrometry. *Anal Chem,* 1997, 69, 3153-3160) .
- 25 Les différentes techniques de spectrométrie de masse, ainsi que les solutions d'interfaçage entre la chromatographie en phase liquide et lesdites techniques de spectrométrie de masse ont été décrites dans l'ouvrage de Niessen, "Liquid Chromatography – Mass Spectrometry, vol 79, Chromatographic Science Series, Ed Jack Cazes, et le couplage LC-MS appliqué à l'analyse des protéines a été plus particulièrement décrit au chapitre 15, pp 501 – 537.
- 30 ETAT DE L'ART DANS L'IDENTIFICATION DES PEPTIDES, PROTEINES ET CARBOHYDRATES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE:
- Les polypeptides sont analysés par spectrométrie de masse avant ou après digestion enzymatique (Cf.
- 35 Roepstroff P. Mass spectrometry in protein studies from genome to function. *Current Opinion in Biotechnology,* 1997, 8, 6-13), par des techniques de spectrométrie de masse utilisant l'ionisation en nébulisation ou en désorption.
- Les modifications post-traductionnelles peuvent être étudiées en soumettant les analytes à des phosphatases ou des glycosylases (Cf. Qin J, Chait BT. Identifications and characterization of
- 40 posttranslational modifications of proteins by MALDI Ion Trap mass spectrometry . *Anal Chem,* 1997, 69, 4002-4009.)

Lorsque l'analyse par spectrométrie de masse a lieu après digestion avec une endopeptidase donnée, on compare les spectres des masses observées avec les banques des spectres des masses théoriques des résidus de digestion avec ladite endopeptidase.

- En spectrométrie de masse MALDI, les échantillons peuvent être déposés sur des membranes de poly(vinylidène difluorure), ou de polyuréthane (Cf. Mc Comb ME, Oleschuk RD, Manley DM, Donald L, Chow A, O'neil JD, Ens W, Stabding KG, Perreault H. Use of non-porous polyurethane membrane as a sample support for matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry of peptides and proteins. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 1997, 11 (15), 1716-22) .
- 10 Tout comme les peptides et les protéines, les glycoprotéines peuvent être analysées par spectrométrie de masse (Cf. Vinh J, Loyaux D, Redeker V, Rossier R.. Sequencing of branched peptides with CID/PSD MALDI-TOF in the low picomoles range: application to the structural study of the posttranslational polyglycylation of tubulin. *Anal. Chem*, 1997, 69, 3979-3985; Harvey DJ. Identification of protein-bound carbohydrates by mass spectrometry. *Proteomics* 2001, 1, 311-328;
- 15 Yamagaki T, Nakanishi H. Ion intensity analysis of post-source decay fragmentation in curved-field reflectron matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of carbohydrates: for structural characterization of glycosylation in proteome analysis. *Proteomics* 2001, 1, 329, 339).

20

#### ETAT DE L'ART DANS LES TECHNIQUES DE MICRO-FABRICATION DES MICRO-COLONNES OU NANO-COLONNES

- Les micro-colonnes de chromatographie peuvent être fabriquées en partie ou en totalité grâce aux techniques employées dans la micro-fabrication telles que photogravure, micro-moulage, micro-emboutissage, photopolymérisation, thermopolymérisation sur des supports pouvant être en silicium ou en verre ou en céramique ou en plastique (Cf. He B, Tait N, Regnier F. Fabrication of Nanocolumns for liquid chromatography. *Anal. Chem*, 1998, 70, 3790-3797 ; Regnier FE, He B, Lin S, Busse J. Chromatography and electrophoresis on chips : critical elements of future integrated, microfluidic analytical systems for life science, TIBTECH, 1999, 17, 101-106 ; Pesek JJ, Matyska MT. Open tubular capillary electrokinetic chromatography in etched fused-silica tubes. *Journal of Chromatography*, 2000, 887, 31-41). Les lits desdites micro-colonnes peuvent être directement gravés lorsque lesdits supports sont à base de silicium ou de verre ou de céramique. Ils peuvent être aussi micro-moulés ou micro-emboutis grâce à des matrices en silicium lorsque lesdits supports sont à base
- 35 de plastiques. Lesdits lits peuvent être revêtus d'un film fin de nature hydrophobe ou hydrophile. Le réseau micro-particulaire desdites micro-colonnes qui constitue lesdites phases stationnaire peut être obtenu par photogravure lorsque lesdits supports intégrés sont à base de silicium ou de verre ou de céramique (Cf. He B., Regnier F. Microfabricated liquid chromatography columns based on collocated monolith support structures, 451-455; He B., Tait N., Regnier F. Fabrication of nanocolumns for liquid chromatography. *Anal. Chem*, 1998, 70, 3790-3797).
- 40 Le réseau microparticulaire peut aussi être obtenu par micro-moulage ou micro-emboutissage ou photopolymérisation ou thermopolymérisation in situ emboutissage lorsque lesdits supports sont à base de plastiques, ou bien peut être constitué de micro ou nano-baguettes insérées dans le dit lit

- desdites micro-colonnes (Cf. Gusev I, Huang X, Horvath C. Capillary columns with in situ formed porous monolithic packing for micro-high performance liquid chromatography and capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A*, 1999, 855, 273-290; Yu C., Svec F., Fréchet J. Towards stationary phases for chromatography on a microchip: molded porous polymer monoliths prepared in capillaries by photo-initiated in situ polymerization as separation media for electrochromatography. *Electrophoresis* 2000, 21, 120-127; Svec F., Peters E.C., Sykora D., Fréchet J. Design of the monolithic polymers used in capillary electrochromatography columns. *J. of Chromatography A.*, 2000, 887, 3-29. Josic D., Buchacher A., Jungbauer A. Monoliths as stationary phases for separation of proteins and polynucleotides and enzymatic conversion. *Journal of Chromatography B*, 2001, 752, 191-205; Ngola SM, Fintschenko Y., Choi WY, Shepodd TJ. Conduct-as-cast polymer monoliths as separation media for capillary electrochromatography ; Pursch M, Sander LC. Stationary phases for capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A*, 2000, 887, 313-326.) Des micro-particules peuvent aussi être immobilisées dans un lit continu (Adam T., Unger KK, Dittmann MM, Rozing GP. Towards the column bed stabilization of columns in capillary electroendosmotic chromatography. Immobilization of microparticulate silica columns to a continuous bed. *J. of chromatography A*, 2000, 327-337; Roed L, Lundanes E, Greibrokk T. Non-aqueous electrochromatography on continuous bed columns of sol-gel bonded large-pore C30 material: separation of retinyl esters. *J. Microcolumns Separations*. 2000. 12(11). 561-567)
- 20 Ledit réseau micro-particulaire desdites micro-colonnes qui constitue la phase stationnaire peut être revêtu d'un film fin de nature hydrophobe ou hydrophile et peut être soumis à des chimies de couplage connues de l'Homme de l'Art pour greffer des molécules caractérisées par principalement par leur polarité et leur amphipathicité.
- 25 La gravure chimique augmente les propriétés de rétention, ainsi que l'atteste la rétention d'un digest tryptique de transferrine en électrochromatographie capillaire sur des micro-canaux de 50 microns de large, et ainsi que le montrent les comparaisons des séparations sur micro-canaux gravés ou non gravés et avec ou sans revêtement ultérieur de Polybrene (Cf. Pesek, Protein and peptides separations on high surface area capillaries, *Electrophoresis*, 1999, 20, 2343-2348).
- 30 Les micro-canaux peuvent être garnis de micro-baguettes de monolithes polymères adéquates pour la séparation des protéines tant par électrochromatographie que par micro-HPLC (Cf. Hjerten, Electroosmosis and Pressure-driven chromatography in chips using continuous beds. *Anal. Chem*, 2000, 72, 81-87).
- 35 La très grande résolution des techniques de micro-moulage de plastique est directement liée à celle des moules en silicium. Elle se situe donc au niveau requis pour envisager la fabrication de phases stationnaires de chromatographie directement moulées dans le plastique grâce à des moules silicium dimensionnés pour fabriquer des phases stationnaires comportant un réseau plastique micro-particulaire très fin, comme par exemple en étant constitué de cubes polymériques de 5 microns
- 40 d'arêtes séparés par des espaces de 500 nanomètres.
- Les techniques de "Molecular Imprinting" quant à elles visent à faire mimer par les plastiques des surfaces de reconnaissance moléculaire de molécules A calquées sur celles de molécules B ayant une affinité pour lesdites molécules A (Cf. Rachkov A, Minoura N. Towards molecularly imprinted



polymers selective to peptides and proteins. The epitope approach. *Biochim. Biophys Acta* 2001. 1544(1-2). 255-266; Haupt K, Mosbach K. Plastic antibodies: developments and applications. *Trends Biotech* 1998. 16(11). 468-75; Ramstrom O, Mosbach K. Synthesis and catalysis by molecularly imprinted materials. *Current Opinion Chem. Biol.* 1999, 3(6). 759-64; Heegaard NH, Nilsson S, Guzman NA. Affinity capillary electrophoresis: important application areas and some recent developments. *J. chromatography B Biomed Sci Appl.* 1998. 715, 29-54.; Schweitz L, Petersson M, Johansson T, Nilsson S. Alternative methods providing enhanced sensitivity and selectivity in capillary electro-separation experiments. *Journal of Chromatography A*, 2000, 892, 203-217)

# 10 ETAT DE L'ART DANS LES TECHNIQUES DE MICRO-FABRICATION:

Pour qu'un système d'analyse chimique ou biochimique puisse être miniaturisé, il faut d'une part que les conduits et composants qui guident ou reçoivent les fluides (microcanaux, micro-réservoirs, micro-mixers, micro-colonnes, etc) soient miniaturisés, d'autre part que les composants qui gèrent le parcours des fluides et des réactifs (micro-vannes, micropompes, micro-capteurs, micro-chauffeurs, etc) soient eux-aussi miniaturisés, et enfin que des connexions puissent s'établir à l'intérieur et vers l'extérieur du dispositif. (Cf. Elwenspoek M, Lammerink TSJ, Miyake R, Fluitman JHJ. Towards integrated microliquid handling systems. *J. Micromech. Microeng.* 1994, 4, 227-245. \_ Verpoorte EMJ, van der Schoot BH, Jeanneret S, Manz A, Widmer HM, de Rooij NF. Three-dimensional micro flow manifolds for miniaturized chemical analysis systems. *J. Micromech. Microeng.* 1994, 4, 246-256, 1994 \_ Schabmueller CGJ, Koch M, Evans AGR, Brumschweiler A. . Design and fabrication of a microfluidic circuitboard. *J. Micromech. Microeng.* 1999, 9, 176-179. \_ Lammerink TSJ, Spiering VL, Elwenspoek M, van den Berg A. Modular concept for fluid handling system. *Proc. IEEE Micro Electro Mechanical Systems*, 1996, San Diego pp389-384 \_ Richter M, Prak A, Eberl M, Leeuwis H, Woias P, Steckenborn A. 1997. A chemical microanalysis system as a microfluid demonstrator. *Proc. Transducers 97, IEEE Chicago*, pp303-306. \_ Kovacs GTA, Petersen K, Albin M. Silicon micromachining: sensors to systems. *Analytical Chemistry*, 1996, 407A - 412A \_ Gravesen P, Branebjerg J, Jensen OS. .Microfluidics. A review. *J. Micromech. Microeng.* 1993. 3. 168-182. \_ Shoji S, Esahi M. Microflow devices and systems. *J. Micromech. Microeng.* 1994. 4. 157-171. \_ Büttgenbach S., Robohm C. Microflow devices for miniaturized chemical analysis systems. *SPIE* 1998, vol 3539, 51-61 \_ Urban G, Jobst G, Moser I. Chemo-and biosensor microsystems for clinical applications. *SPIE* 1998. Vol 3539, 46-50).

Il pourra être envisagé des techniques et des fabrications séparées d'une part pour les supports avec micro-conduits et microcanaux, d'autre part pour les micro-composants, quitte à procéder à un montage, de préférence automatisé, en fin de fabrication.

Parmi les critères qui aident à orienter le choix d'un mode de fabrication pour une pièce donnée d'un dispositif miniaturisé d'analyse chimique ou biochimique figure le ratio d'aspect (aspect ratio en anglais) qui représente l'aptitude à respecter les côtes d'un plan en trois dimensions, en particulier à respecter un profil à partir de lignes brisées et non pas à partir de courbes

La fabrication des systèmes miniaturisés, au moins dans une première phase de fabrication, part la plupart du temps de supports plans et plats (parallèles à un plan et peu épais), dits en 2D, où l'essentiel des composants est fabriqué à partir de gravures, d'ablations et de dépôts sur surface plane.

- 5 La possibilité existe aussi maintenant de faire des composants de moins en moins plans et plats tout en respectant de plus en plus finement un profil de fabrication . Ceci est obtenu entre autres grâce à l'amélioration des techniques subtractives (gravure chimique, ablation physique), à l'amélioration des techniques additives (dépôts tels que électrodéposition (electroplating), electroless plating, par vapeur chimique (CVD et PEVCD)) et enfin à l'amélioration des techniques de micro-moulage et de micro-emboutissage.

10 Très souvent cependant, les techniques de micro-usinage d'une surface plane n'ont pas assez progressé soit dans la profondeur limite d'usinage, soit dans les techniques de dépôt ou de moulage pour sculpter des dispositifs où des formes en 3D avec un rapport élevé hauteur/ surface de base sont requises.

- 15 Une solution possible consiste en des assemblages de plusieurs pièces, que l'on peut appeler «sous-composants», qui ont un degré de planéité et de platitude suffisant pour être accessibles aux techniques d'usinage d'une surface plane. Dans certaines configurations, on fabrique des sous-composants juste assez plans et juste assez plats pour pouvoir être micro-fabriqués. Puis on les superpose et assemble par fusion ou collage après un éventuel emboîtement ou enclenchement, ce
- 20 permet de reconstituer le micro-système voulu (US Patent N° 5 932 315: Microfluidic structure assembly with mating microfeatures \_ US Patent N° 5 611 214. Microcomponent sheet architecture \_ US Patent 5252294. Micromechanical structure).

Pour que cette solution soit applicable, il faut entre autres choses que le microsystème voulu puisse tenir dans volume plus ou moins aplati représenté par la superposition de sous-composants eux-mêmes nettement aplatis.

- 25 Mais il arrive aussi que la fabrication de certains composants ne puisse pas faire appel à des techniques de micro-usinage des surfaces planes. Ce peut être le cas parce que les formes sont trop sophistiquées pour être techniquement réalisables ou pour être fabriquées par ces techniques à un coût raisonnable. Ce peut aussi être le cas parce que la fonction demandée à ces composants s'accommode mal de la miniaturisation elle-même ou des techniques de miniaturisation. La conséquence d'une telle situation est que ces composants vont rester à une macro-échelle, et que le packaging du microsystème
- 30 devra être conçu assembler ou connecter des macro-pièces avec des micro-pièces.( van der Schoot BH, Interfacing micro and macro mechanical worlds. J. Micromech. Microeng.1995, 5, 72-73 ).

- 35 Parmi les très nombreuses techniques de micro-fabrication figurent entre autres des techniques de gravure chimique humide de photolithographie, de gravure sèche avec divers rayonnements photoniques ou particuliers, de micro-façonnage avec micro-outillages ou lasers, de découpage, d'ablation, d'assemblage par fusion ou d'assemblage anodique, de collage, de soudure, de moulage, d'estampage à chaud (hot-embossing en anglais), de poinçonnage, de forage, d'électrodéposition, de
- 40 dépôt de vapeur chimique, de fabrication par progression par feuilles successives (lamination en anglais).

La gravure humide est appliquée depuis une quarantaine d'années au silicium et à ses dérivés dans l'industrie de la micro-électronique. Elle est peut être isotrope. Elle peut aussi être anisotrope lorsqu'on cherche à profiter de l'orientation des cristaux et des propriétés des substances gravantes pour maîtriser sa direction. (Sato K., Shikida M, Yamashiro M, Tsunekawa M, Ito S. Characterization of anisotropic etching properties of single crystal silicon: surface roughening as a function of crystallographic orientation. the 11th IEEE International Workshop on MEMS, Heidelberg, Germany, 1998, 201-206).

Les techniques de gravure humide tant isotropes qu'anisotropes possèdent de nombreuses variantes. En effet, les nouvelles connaissances en physique des matériaux, chimie orbitale, physique des rayonnements, dopage des matériaux, permettent de tirer profit de la structure atomique de différents matériaux utilisés, aident à concevoir des méthodes de contrôle de la direction, de la profondeur et de l'arrêt des gravures sur différentes couches et suggèrent de nouvelles pistes pour de nouvelles techniques .

Chacune des techniques citées possède de nombreuses variantes dont l'éventail ne cesse de se développer à un rythme soutenu.

Les nouvelles connaissances en traitement de surface permettent d'affiner les qualités demandées aux matériaux en cours de fabrication ou les qualités demandées au produit fini.

Les nouvelles connaissances en thermophysique et thermochimie différentielle entre deux matériaux suggèrent des nouvelles techniques de fusion, de moulage, d'estampillage, de poinçonnage, en particulier des plastiques.

La microfabrication des polymères par stéréolithographie est venue grossir le champ de ces techniques, en particulier pour le prototypage rapide en 3D.

Selon que l'on grave un matériau dans sa masse ou que l'on grave seulement des couches superficielles, on parle respectivement de "bulk micromachining" et de "surface micromachining".

Toutes ces techniques de micro-fabrication sont applicables non seulement à la fabrication des produits finis, mais aussi à celles des outils utilisés pour effectuer ces micro-fabrications, ainsi qu'aux micro-moules et aux micro-matrices d'estampage à chaud utilisés pour micro-réplicuer en masse un micro-objet.

Parmi les autres critères qui vont aider à sélectionner un mode et un matériau de fabrication figurent les qualités intrinsèques des matériaux composant l'objet fini, et les perspectives de maîtrise des coûts de fabrication.

Certaines techniques supposent un mode de fabrication moins adapté à la fabrication de masse: gravure sèche par rayonnements photoniques ou particuliers (Bean. Anisotropic etching of silicon. 1978. vol ED-25(10), pp 1185-1193. IEEE Transactions of Electron devices.), ablation lasers, gravure avec micro-pointe.

Mais ces techniques peuvent être utilisées comme première étape dans un process de fabrication de masse d'objets en plastique ou en céramique ou en métal selon des procédés appelés "par réplcation" (Niggemann M., Ehrfeld W., Weber L.. Fabrication of miniaturized biotechnical devices. SPIE Conference on Micromachining and Microfabrication Process Technology IV, Santa Clara, California, Sept 1998, vol 3511, pp 204 - 213 \_ Ruprecht R, Bacher W, Hausseil JH, Piottier V. Injection Molding of LIGA and LIGA-similar microstructures using filled and unfilled thermoplastics. SPIE, vol 2639, pp146-158 \_ Fleming JG, Barron CC, Novel silicon fabrication process for high aspect ratio

- micromachined parts, SPIE vol 2639, 185-190 \_ Keller CG, Howe RT. Nickel-filled HEXSIL thermally actuated tweezers, 8<sup>th</sup> International Conference on Solid-State Sensors and Actuators, Stockholm, Sweden, 1995, June 25-29, pp 376-379. \_ Selvakumar A, Najafi K, High density vertical comb array microactuators fabricated using a novel bulk/polysilicon trench refill technology, Solid State Sensor and Actuator Workshop, Hilton head , 1994, SC June 13-16, pp 138-141 \_ Becker H., Dietz W.. Microfluidic devices for  $\mu$ -TAS applications fabricated by polymer hot embossing. Proceedings of SPIE. Microfluidic Devices and Systems. 21-22 sept 1998, Santa Clara, pp177-182 \_ Grzybowski BA, Haag R, Bowden N, Whitesides GM. Generation of micrometer-sized patterns for microanalytical applications using a laser direct-write method and microcontact printing. Anal. Chem, 1998, 70, 4645-4652 \_ Martynova L, Locascio E, Gaitan G, Kramer W, Christensen RG, MacCrehan WA.. Fabrication of plastic microfluid channels by imprinting methods. Anal. Chem. 1997, 69, 4763-4789) .
- On peut en effet tirer de ces techniques à vocation unitaire un profit considérable pour micro-fabriquer des masters de réplcation (par exemple des micro-moules pour moulage par injection ou pour moulage réactif, ou des micro-matrices d'estampage à chaud), à condition de réunir deux qualités: un ratio d'aspect élevé et une surface compatible avec les exigences du process de réplcation. En effet, certaines étapes dans la réplcation sont cruciales, en particulier la séparation de la matrice de réplcation de l'objet nouvellement réplqué.
- Cependant, la complexité du process choisi pour fabriquer une matrice de réplcation est à prendre en compte. Par exemple, on peut fabriquer avec une très grande précision un micro-moule de moulage par injection ou une micro-matrice d'estampage à chaud avec la technique LIGA, où un rayonnement synchrotron issu d'une machinerie très onéreuse, très rare et très lourde, est utilisé dans les premières étapes. Mais de nouvelles techniques de gravure sèche et surtout de gravure humide avec des performances accrues peuvent se révéler plus souples avec des ratios d'aspect qui se rapprochent de plus en plus de la technique LIGA. Ainsi le gravure humide anisotrope a beaucoup progressé (Hölke A., Henderson HT. Ultra-deep anisotropic etching of (110) silicon; J. Micromech. Microeng. 1999, 9, 51-57). D'autres résultats montrent aussi un progrès dans les performances de la gravure humide isotrope (Wet chemical isotropic etching procedures of silicon - a possibility for the production of deep structured microcomponents. Schwesinger N, Albrecht A.. SPIE vol 3223, p 72-79).
- Quant aux techniques à vocation unitaire, certaines d'entre elles pourront être adaptées à la fabrication en masse lorsque les instruments de fabrication eux-mêmes qui servent à les mettre en oeuvre seront miniaturisés et pourront être utilisés de manière massivement parallèles. C'est une perspective proche pour l'ablation laser (grâce à la fabrication de micro-lasers) et la gravure par micropointe, plus lointaine pour certaines techniques de gravure sèche.
- Aujourd'hui la fabrication de masse est plutôt réservée aux techniques qui ont naturellement cette vocation, dont entre autres: gravure humide sur silicium et dérivés, et sur verres, photolithographie UV sur photorésists, fabrication par progression par couches successives de polymères avec utilisation de couches sacrificielles selon Webster et Mastrangelo cités ci-après en référence, moulage de poly(dimethylsiloxane) (PDMS), moulage de plastiques par injection avec micro-moule, moulage de céramiques et de métaux, estampage à chaud de polymères avec micro-matrice d'estampage.

Comptant parmi ces dernières, la gravure humide est désormais appliquée à tous types de dérivés du silicium et au quartz, ainsi qu'aux différents types de verre (par exemple pyrex, verres boro-phospho-silicatés, etc).

- 5 En matière de microfluidique, un critère important est la compatibilité avec l'utilisation de la micro-électrophorèse, de la micro-électrophorèse 2D et de la micro-électro-chromatographie pour séparer les molécules. Est importante aussi et surtout la compatibilité avec l'électro-osmose pour mouvoir des fluides, cette technique ayant l'avantage d'éviter des composants telles que microvannes et micropompes. Comme la micro-électrophorèse et la micro-électrophorèse 2D, l'électro-osmose ainsi
- 10 que la micro-électro-chromatographie alliée à l'électro-osmose nécessitent de gros voltages. En conséquence, elles sont incompatibles en pratique avec l'utilisation du silicium. Par contre, elle sont compatibles avec les verres et les plastiques. (Manz A., Effenhauser CS, Burggraf N, Harrison DJ, Seiler K, Fluri K. Electroosmotic pumping and electrophoretic separations for miniaturized chemical analysis systems. J. Micromech. Microeng., 1994, 4, 257-265. - Mac
- 15 Cormick RM, Nelson JR, Alonso-Amigo MG, Benvegna DJ, Hooper HH. Microchannel electrophoretic separations of DNA in injection-molded plastic substrates. Anal. Chem., 1997, 69, 2626-2630 \_ Jacobson SJ, Kutter JP, Culbertson CT, Ramsey JM. Rapid electrophoretic and chromatographic analysis on microchips,  $\mu$ -TAS 1998, Banff, Canada, 315-318. \_ Microfabricated liquid chromatography columns based on collocated monolith support structures,  $\mu$ -TAS 1998, Banff,
- 20 Canada, 451-455. \_ Paulus A., Williams SJ, Sassi AP, Kao PH, Tan H, Hooper HH. Integrated capillary electrophoresis using glass and plastic chips for multiplexed DNA analysis, pp 94-103. SPIE Proceedings Vol 3515 #3515-08. \_ PM Martin, DW Matson, Bennett WD, Hammerstrom DJ. Fabrication of plastic microfluidic components. Polymer-based microfluidic analytical devices. SPIE Proceedings Vol 3515 # 3515-19).
- 25 Toutefois on peut envisager d'utiliser d'autres forces que la force électro-osmotique pour mouvoir les liquides où l'utilisation de micro-vannes et micropompes peut être minimisée, comme la force centrifuge (Madou MJ, Kellogg GJ: The LabCD: a centrifuge-based microfluidic platform for diagnostics. SPIE vol 3259, pp 80-93).
- 30 D'autres modes de propulsion de liquides peuvent être envisagés comme la force thermo-capillaire ( Burns MA, Mastrangelo CH, Sammarco T, Man FP, Webster JR, Johnson BN, Foerster B, Jones D, Fields Y, Kaiser AR, Burke DT. Microfabricated structures for integrated DNA analysis. P.N.A.S. 1996, vol. 93, pp5556-5561), ou les forces couplées à des alternances surfaces ou raies hydrophobes-
- 35 surfaces ou raies hydrophiles (Jones DK, Mastrangelo CH, Burns MA, Burke DT. Selective hydrophobic and hydrophilic texturing of surfaces using photolithographic photodeposition of polymers. SPIE vol 3515, 136- 143 \_ Eastman Kodak.. Device for fluid supply of a micro-metering device; US Patent N° 5805189 \_ Beckton Dickinson. DNA microwell device and method.US Patent N° 5795748).
- 40 Par ailleurs, une publication récente (Characterization of silicon-based insulated channels for capillary electrophoresis, Van den Berg et al.,  $\mu$ -TAS 98, Canada, pp-327-330) montre que des travaux sont

entrepris pour faire acquérir au silicium une compatibilité avec de gros voltages, la technique de fabrication employée étant une gravure sèche (deep reactive ion etchnig).

- 5 La transparence, qualité recherchée en analyse biologique, est une qualité partagée entre les verres (Kricka L, Wilding P, et al.. Micromachined Glass-Glass Microchips for In Vitro Fertilization, Clinical Chemistry, 1995, 41, 9, 1358-1359) et certains plastiques.

- 10 Certains verres ayant les bons compromis de conditions de dopage et d'expansion thermique, ont la qualité de pouvoir s'assembler facilement au silicium (Albaugh KB, Rasmussen DH, "Mechanisms of anodic bonding of silicon to pyrex glass. Proc IEEE Solid State Sensors and Actuators Workshop. 1988. 109-110).

- 15 La gravure humide sur verre, par nature isotrope, est parfaitement maîtrisée (A new fabrication method for borosilicate glass capillary tubes with lateral inlets and outlets. Grétilat MA, Paoletti F, Thiébaud P, Roth S, Koudelka-Hep M, de Rooij NF. Sensors and Actuators A 60, 1997, 219-222. \_ Corman T, Enoksson P, Stemme G. Deep wet etching of borosilicate glass using an anodically bonded silicon substrate as mask J. Micromech. Microeng., 1998, 8, 84-87.)

- 20 Comparés aux plastiques, les verres offrent entre autres pour l'analyse biochimique la compatibilité avec la détection par fluorescence et un bon coefficient d'échange thermique. Ils sont gravés cependant uniquement selon un mode isotrope, ce qui par exemple limite aujourd'hui la forme des microcanaux sur verre à une forme circulaire.

- 25 Les plastiques, même s'ils ont une moindre compatibilité avec la détection par fluorescence et un moindre coefficient d'échange thermique que les verres, ont de nombreuses autres qualités, dont principalement le faible prix de revient.

- 30 Des travaux qui portent sur l'amélioration de la détection par fluorescence avec les plastiques et l'élimination des bruits de fond (en modulant la vitesse de migration des analytes et en utilisant une source lumineuse LED) ont été rapportés par Wang Shau-Chun et Michael D. Morris de l'Université du Michigan à la 10 ème "Frederick Conference on Capillary Electrophoresis " en Octobre 1999.

- 35 Le très faible coût de fabrication des objets micro-fabriqués en plastique vient du faible prix de la matière première, de la simplicité des process de production qui peuvent être envisagés, entre autres du fait de l'aptitude à la réplique par moulage ou par estampage à chaud, voire même pour les plastiques photoresists à la photolithographie .

- Un inconvénient des plastiques est en voie d'être surmonté: il était difficile de déposer le métal de la circuiterie électrique une fois le produit fini. Mais des solutions voient le jour, comme le marquage avec une encre conductrice.

- 40 Parmi les plastiques, il est intéressant de faire la classification suivante:

- les photoresists, usinables entre autres par photolithographie, dont par exemple le PMMA pour la lithographie aux rayons X, SU-8 ( photorésist négatif) et Novolac de Hoescht et AZ 9260 (photoresists positif) pour la photolithographie UV (Lorenz H, Despont M, Fahrni N, LaBianca

- N, Renaud P, SU-8: a low-cost negative resist for MEMS, J. Micromech. Microeng, 1997, 7, 121-124. \_ Loechtel B, Maciossek A, Surface micro components fabricated by UV depth lithography and electroplating, SPIE vol 2639, 174- 184 \_ Conédéra V, Le Goff B, Fabre N. Potentialities of a new positive photoresist for the realization of thick moulds, J. Micromech. Microeng, 1999, 9, 173-175. \_ Guérin LJ, Bossel M, Demierre M, Calmes S, Renaud P. Simple and low cost fabrication of embedded microchannels by using a new thick-film photoplastic. Proceedings of Transducers, Chicago, USA, 1997, pp1419-1422.)
- 10 - les élastomères siliconés, dont le poly(dimethylsiloxane) (PDMS), utilisables entre autres par moulage simple, (Mac Donald JC, Duffy DC, Anderson JR, Chiu DT, Hongkai Wu, Schueller O, Whitesides GM, Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane), Electrophoresis 2000, 21, 27-40. \_ Ocvirk G, Munroe M; Tang T, Oleschuk R, Westra K, Harrison DJ, Electrokinetic control of fluid flow in native poly(dimethylsiloxane) capillary electrophoretic devices, Electrophoresis 2000, 21, 107-115.)
- 15 - un ensemble de plus en plus vaste usinable entre autres par moulage par injection et par emboutissage à chaud. Parmi ces derniers, on peut citer des polyamides (PA), des polycarbonates (PC), des polyoxyméthylènes (POM), le cyclopentadiène norbornène copolymère (COC), des polyméthylmethacrylates (PMMA), le polyéthylène basse densité (PE-LD), le polyéthylène haute
- 20 densité (PE-HD), le polypropylène (PP), des polystyrènes (PS), le cyclooléfin copolymère (COC), le polyetheretherketone (PEEK). (Niggemann M., Ehrfeld W., Weber L.; Fabrication of miniaturized biotechnical devices, SPIE , vol 3511, pp 204 - 213 \_ Becker H, Gärtner C, Polymer microfabrication methods for microfluidic analytical applications, Electrophoresis 2000, 21, 12-26).
- 25 D'autres plastiques encore peuvent être microfabriqués: le polybutylène téréphtalate (PBT), le polyphénylène ether (PPE), le polysulfone (PSU), le liquid crystal polymer (LCD), le polyetherimide (PEI). Le polylactide biodégradable peut aussi être microfabriqué.
- 30 Le PMMA et le PC sont couramment employés dans le moulage par injection et l'estampage à chaud. Le COC est couramment cité dans l'estampage à chaud.
- Les procédés de fabrication de masse des plastiques sont très variés. On peut citer comme principaux procédés:
- 35 - l'impression par matrices filiformes (wire imprinting) (Locascio LF, Gitan M, Hong J, Eldefrawi M, Plastic microfluidic devices for clinical measurements,  $\mu$ -TAS 1998, 367- 370 \_ Chen YH, Chen SH, Analysis of DNA fragments by microchip electrophoresis fabricated on poly(methyl methacrylate) substrates using a wire-imprinting method, Electrophoresis 2000, 21, 165-170)
- 40 - l'estampage à chaud (Hot embossing) (Becker H., Dietz W, Dannberg P. Microfluidic manifolds by polymer hot embossing for  $\mu$ -TAS applications.  $\mu$ -TAS 1998, Banff, Canada, 253-256. \_ Kempen LU, Kunz RE, Gale MT. Micromolded structures for integrated optical sensors. SPIE vol 2639, 278-285.).

- le moulage par injection (Hagmann P, Ehrfeld W. Fabrication of microstructures of extreme structural heights by reaction injection molding, International Polymer Processing, 1989, Vol IV, N°3, pp 188-195. \_ Weber L, Ehrfeld W, Freimuth H, Lacher M, Lehr H, Pech B. . Micro-moulding - a powerful tool for the large scale production of precise microstructures. Proc. SPIE Symp. Micromachining and Microfabrication, 1996, vol 2879, pp 156- 167.).
- le moulage simple pour les élastomères siliconés (Kumar A, Whitesides GM. Appl. Phys. Lett, 1993, 63, 2002-2004 \_ Wilbur JL, Kumar A, Kim E, Whitesides GM, Adv. Mat. 1994, 7, 600-604.).
- la photolithographie des photoresists, dont par exemple la lithographie aux rayons X pour le PMMA, la photolithographie UV pour le photopolymère Epson SU-8.  
 Dans cette dernière, trois procédés sont couramment utilisés (Renaud P., Van Lintel H, Heusckel M, Guérin L.. Photo-polymer microchannel technologies and applications.  $\mu$ -TAS 1998, Banff. Canada, pp17-22.). Ils commencent toutes trois par le dépôt d'une première couche de SU-8 qu'on expose aux UV. Pour la fabrication d'un microcanal, la première couche de photoresist fait le fond dudit micro-canal à section rectangulaire. La deuxième couche de photoresist fait les parois verticales dudit micro-canal. La troisième couche de photoresist termine le capillaire en constituant la partie couvercle.
  - \* le "fill process" . On procède par remplissage avec une couche sacrificielle, comme par exemple l'Araldite GT6063 de Ciba-Geigy entre la deuxième et la troisième couche de photoresist. En fin de process, la couche sacrificielle est dissoute.
  - \* le "mask process" . On interpose une couche de métal sur la deuxième couche de photoresist qu'on ne développe pas. Cette deuxième couche de métal masque le microcanal. Une troisième couche de photoresist est déposée puis illuminée. Puis le photoresist est développé à l'intérieur et à l'extérieur dudit micro-canal.
  - \* le "lamination process", un procédé sans dissolution, où l'on déroule une couche de film sec de SU-8 sur la construction faite à partir de la première couche de photoresist pour la sceller.
- la fabrication par progression par couches successives de polymères , avec utilisation de couches sacrificielles, dont par exemple le process utilisé par Webster JR, Burns MA, Mastrangelo CH, Man PF, Jones DK, Burke DT., (Webster JR, Burns MA, Burke DT., Mastrangelo CH , An inexpensive plastic technology for microfabricated capillary electrophoresis chips,  $\mu$ -TAS 1998, 249-252), une technique qui part de parylène déposé sur du polycarbonate ou du silicium avec utilisation ultérieure de photoresist sacrificiel. L'avantage de cette technique réside dans le scellement des microcanaux naturellement inclus dans la méthode.

La microfabrication par laser des plastiques est aussi possible, mais en tant technique unitaire. Ce peut être par exemple l'ablation directe dans la masse ou la découpe d'un joint que l'on glissera en sandwich entre deux couvercles.

Les traitements de surface de plastiques dépendent de l'application et du matériau utilisé. Par exemple, il faut souvent rendre hydrophile une surface hydrophobe. Pour une application d'analyse d'ADN, ou



d'analyse de protéines, il faut éviter des liaisons avec le substrat par des traitements de surfaces spécifiques respectivement à ces deux types d'analyse et spécifiques du matériau choisi.

Pour assembler et sceller d'un couvercle des microfabrications en plastique, plusieurs procédés

5 existent. On peut citer entre autres:

- le scellement par déroulement à chaud d'une feuille recouvrante de PET d'environ 30 microns  
coatée avec une couche d'un matériau, le plus souvent un polymère que l'on porte à son point de  
fusion pour qu'elle se mélange avec le substrat,
- le scellement d'un couvercle ou l'assemblage d'une partie complémentaire par collage, ou par  
10 pression à chaud, ou par soudure au laser, ou par l'emploi d'ultrasons, ou par l'emploi de plasmas,  
etc.

#### ETAT DE L'ART DANS LES MICRO-LEVIERS:

- 15 La détection d'interactions spécifiques est possible grâce à la mesure de la variation de propriétés  
mécaniques de microstructures. Dans la plupart des cas, ces microstructures se présentent sous la  
forme de microleviers. ( Betts TA, Tipple CA, Sepaniak MJ, Datskos PG. Selectivity of chemical  
sensors based on micro-cantilevers coated with thin polymer films. *Anal. Chimica Acta*, 2000, 422,  
89; Fagan B, Xue B, Datkos P, Sepaniak M.. Modification of micro-cantilevers sensors with sol-gels  
20 to enhance performance and immobilize chemically selective phases. *Talanta*, 2000, 53, 599; Wadu-  
Mesthrige K, Amro NA, Garro JC, Xu S, Liu G-Y. Fabrication of nanometer-sized proteins patterns  
using atomic force microscopy and selective immobilization. *Biophysical Journal*. 2001, 80, 1891-  
1899; Viani MB, Pietrasanta LI, Thompson JB, Chand A, Gebeshuber IC, Kindt JH, Richter M,  
Hansma HG, Hansma PK. Probing protein-protein interactions in real time. *Nat Struct Biol*. 2000  
25 Aug;7(8):644-7; Luckham PF, Smith K. Direct measurement of recognition forces between proteins  
and membrane receptors. *Faraday Discuss*. 1998;(111):307-20; discussion 331-43; Micic M, Chen A,  
Leblanc RM, Moy VT. Scanning electron microscopy studies of protein-functionalized atomic force  
microscopy cantilever tips. *Scanning*. 1999 Nov-Dec;21(6):394-7; Bryant Z, Pande VS, Rokhsar DS.  
Mechanical unfolding of a beta-hairpin using molecular dynamics. *Biophys J*. 2000 Feb;78(2):584-9;  
30 Willemsen OH, Snel MM, van Noort SJ, van der Werf KO, de Grooth BG, Figdor CG, Greve J.  
Optimization of adhesion mode atomic force microscopy resolves individual molecules in topography  
and adhesion. *Ultramicroscopy*. 1999 Oct;80(2):133-44; Willemsen OH, Snel MM, Kuipers L, Figdor  
CG, Greve J, de Grooth BG. A physical approach to reduce nonspecific adhesion in molecular  
recognition atomic force microscopy. *Biophys J*. 1999 Feb;76(2):716-24; Heinz WF, Hoh JH. Relative  
35 surface charge density mapping with the atomic force microscope. *Biophys J*. 1999 Jan;76(1 Pt  
1):528-38; Eckert R, Jeney S, Horber JK. Understanding intercellular interactions and cell adhesion:  
lessons from studies on protein-metal interactions. *Cell Biol Int*. 1997.21(11):707-13; Oberlueitner  
H, Schneider SW, Henderson RM. Structural activity of a cloned potassium channel (ROMK)  
monitored with the atomic force microscope : the « molecular sandwich » technique *PNAS*, 1997,  
40 94(25), 14144-9; You H, Yu L. Investigation of the image contrast of tapping-mode atomic force  
microscopy using protein-modified cantilever tips. *Biophys J*. 1997 Dec;73(6):3299-308; Tokunaga  
M, Aoki T, Hiroshima M, Kitamura K, Yanagida T. Subpiconewton intermolecular force microscopy.  
*Biochem Biophys Res Commun*. 1997 Feb 24;231(3):566-9; Mitsui K, Hara M, Ikai A. Mechanical

unfolding of alpha2-macroglobulin molecules with atomic force microscope. FEBS Lett. 1996 Apr 29;385(1-2):29-33; Florin EL, Moy VT, Gaub HE. Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs. Science. 1994 Apr 15;264(5157):415-7; Fritz J, Baller MK, Lang HP, Rothuizen H, Vettiger P, Meyer E, Guntherodt H, Gerber C, Gimzewski JK. Translating biomolecular recognition into nanomechanics. Science. 2000 Apr 14;288(5464):316-8 ; Baller MK, Lang HP, Fritz J, Gerber C, Gimzewski JK, Drechsler U, Rothuizen H, Despont M, Vettiger P, Battiston FM, Ramseyer JP, Fornaro P, Meyer E, Guntherodt HJ. A cantilever array-based artificial nose. Ultramicroscopy. 2000 Feb;82(1-4):1-9).

Des mesures en statique ou en dynamique sont envisageables.

- 10 En statique, la formation d'une couche à la surface du levier lors d'une interaction spécifique engendre un effet de contrainte mécanique qui se traduit par une courbure du levier. La sensibilité est dépendante de la raideur du microlevier. Elle est de l'ordre de 0.1 N/m en général voire inférieure. En dynamique, l'ajout d'une masse consécutive à une interaction spécifique sur un microlevier résonnant engendre une diminution de sa fréquence de résonance. La sensibilité sera d'autant plus
- 15 importante que la fréquence de résonance et le facteur de qualité seront élevés. Dans ce cas, les raideurs sont plus importantes entre 1 et 100 N/m et les facteurs de qualité sont compris entre 10 et 500 dans l'air, entre 1 et 10 dans les liquides. La sensibilité d'une telle détection est fortement augmentée si on effectue les mesures sous vide (le facteur de qualité peut atteindre des valeurs supérieures à  $10^4$ ).

20

- Une telle approche suppose que l'on peut mesurer très précisément la déflexion dans le cas d'une mesure en statique ou la fréquence de résonance dans le cas d'une mesure en dynamique. Deux types de mesure sont possibles. Une première approche est basée sur le principe de la déflexion optique laser qui est utilisé comme système de détection dans les microscopes à force atomique commerciaux. Il
- 25 s'agit d'une détection externe. Cette technique est très sensible et permet d'accéder à des variations de déflexion inférieures à l'angström ou à des variations de fréquence de résonance de quelques hertz. Elle est utilisée dans la majeure partie des cas (cf. brevets WO 00/14539 ou US 5,445,008 ou J.Fritz et al., Science 288, 316, 2000). La seconde approche consiste à intégrer sur le microlevier la fonction de détection. Elles sont en général de type piézorésistive (cf. brevet US 5,807,758 ou J. Thaysen et al.,
- 30 MEMS, 401, Interlaken, Janvier 2001) ou piézoélectrique (cf. Brevets US 5,719,324 ou US 6,054,277). L'avantage de cette deuxième approche est qu'elle permet, même si les sensibilités sont moindres, d'augmenter la compacité du système et surtout d'avoir une transduction électrique directe ce qui le rend facilement intégrable dans un système plus complexe.

- Les microleviers peuvent être revêtus d'une molécule particulière qui va lui conférer des propriétés
- 35 d'adsorption ou d'affinité. En ce qui concerne le positionnement de la partie active (traitée spécifiquement pour une reconnaissance moléculaire particulière) sur la surface du microlevier, elle peut s'étendre sur toute la surface du microlevier dans le cas d'une mesure en statique (effet de contrainte). L'effet de contrainte étant maximal à l'encastrement du microlevier, une surface active réduite à la zone d'encastrement du microlevier peut être suffisante. Dans le cas d'une mesure en
- 40 dynamique, si on considère que la masse ajoutée ne modifie pas les propriétés de raideur du microlevier, la partie active doit être positionnée à l'extrémité du microlevier. Cependant, une partie active couvrant la totalité de la surface du microlevier est envisageable.

Les techniques de fabrication de ces microleviers sont très simples dans le cas où ils sont utilisés avec une détection optique externe. Des micro-usinages de surface et de volume associées à des dépôts de couches minces permettent d'élaborer des leviers en silicium, en oxyde de silicium, en nitrure de silicium. Ces microleviers peuvent être également métallisés (or, platine...). Les dimensions de ces microleviers sont typiquement de quelques centaines de microns pour la longueur, quelques dizaines de microns pour la largeur et quelques dixièmes de microns (pour une détection en statique) ou quelques microns (pour une détection en dynamique) pour l'épaisseur. Bien évidemment, les propriétés mécaniques des matériaux utilisés ainsi que les dimensions des microleviers vont modifier leurs raideurs et leurs fréquences propres de résonance.

10

La réalisation de microleviers intégrant la fonction de détection est plus complexe et nécessite un nombre d'étapes de fabrication plus important. D'autre part, il faut prévoir les connexions électriques et ce nombre de connexions va évidemment croissant avec le nombre de microleviers.

Dans le cas d'une détection piézoélectrique, le nombre de connexions est égale à 2 par microlevier, la première pour l'électrode supérieure et la seconde pour l'électrode inférieure. L'électrode inférieure est en général mise à la masse et toutes les électrodes inférieures sont connectées ensemble pour former une masse commune. Il y a donc  $(n+1)$  connexions électriques pour  $n$  bras de leviers piézoélectriques, ce qui réduit sensiblement le nombre de connexions électriques. L'autre avantage d'une détection piézoélectrique est qu'elle permet d'assurer non seulement la fonction de détection mais également la fonction d'actionnement (mise en résonance dans le cas d'une mesure en dynamique) grâce à l'effet piézoélectrique direct et inverse. Il y a cependant deux inconvénients à utiliser une détection piézoélectrique. Le premier est lié au fait que les technologies d'élaboration de couches minces piézoélectriques (sol-gel ou évaporation radio fréquence) sont complexes et leur compatibilité avec les technologies silicium problématiques (effets d'interface notamment). Le deuxième inconvénient concerne la stabilité des propriétés ferroélectriques et piézoélectriques qui sont sujettes à des dérives thermiques, des effets d'hystérésis et surtout de vieillissement et de fatigue ce qui limite très fortement leur durée de vie pour des utilisations en dynamique.

Dans le cas d'une détection piézorésistive (cf. E. Cocheteau, C. Bergaud, B. Belier, L. Bary, R. Plana « Formation of ultra-shallow p+/n junctions with  $\text{BF}_2$  implantation for the fabrication of improved piezoresistive cantilevers », Transducers'2001/Eurosensors XV, Munich, 10-14 juin 2001), le nombre de connexions est égal à 2 au minimum pour chaque microlevier soit  $2n$  connexions électriques pour  $n$  microleviers. Ce nombre peut être égal à 4 si les piézorésistances sont connectées en pont de Wheatstone ce qui donne  $4n$  connexions électriques. L'intégration d'un pont de Wheatstone permet de réduire la compacité du système complet par rapport à un montage avec un pont de Wheatstone externe. En outre, il permet de s'affranchir des effets de dérives thermiques. L'inconvénient d'une détection piézorésistive dans le cas d'une mesure en dynamique est qu'elle suppose que l'on dispose d'une excitation mécanique externe ou bien que les facteurs de qualité des microleviers sont suffisamment importants ( $>100$ ) pour que la fréquence de résonance soit détectable en bruit blanc (excitation thermomécanique due au mouvement brownien). Il y a deux avantages à utiliser une détection piézorésistive. Le premier est que la réalisation de microleviers piézorésistifs est relativement simple et parfaitement compatible avec les technologies de la microélectronique silicium. Le second avantage est la sensibilité plus importante d'une détection piézorésistive par rapport à une détection piézoélectrique.

## FIGURES:

La Figure 1 représente un support intégré (67) pour l'analyse comparative chimique ou biochimique de deux échantillons, de forme rectangulaire, et pourvu d'un lot (1) de (*i*) micro-colonnes chromatographiques de fractionnement (2) avec « gradient de longueur », le terme « gradient de longueur » s'entendant par le fait que chaque micro-colonne de fractionnement (2) diffère de sa voisine d'un très petit élément de longueur.

La Figure 2 représente un support intégré (67) pourvu d'un lot (1) de (*i*) micro-colonnes chromatographiques de fractionnement (2) avec « gradient de longueur », le terme « gradient de longueur » s'entendant par le fait que chaque groupe (3) de 4 micro-colonnes de fractionnement (2) diffère de son voisin d'un très petit élément de longueur.

La Figure 3 représente le détail du système d'élution digitalisée de l'invention, caractérisé en ce que chaque micro-colonne (2) est intersectée par un micro-canal de capture (10), chaque micro-canal de capture accédant à une micro-aire de détection (8).

La Figure 4 représente une perspective du dispositif de capture de la Figure 3 selon une configuration de micro-fabrication où le croisement d'un micro-canal de capture (10) en aval d'une micro-colonne d'enrichissement (108) et d'une desdites micro-colonnes de fractionnement (2) s'effectue sur un support dans premier plan vertical, tandis que l'aire de détection (8) avec micro-colonnes secondaires (20) et microleviers (21) est située sur un deuxième support collé au premier et situé dans un deuxième plan vertical, et tandis que les produits d'élution primaire sont évacués par un canal (6) situé sur support collé au premier et situé dans un troisième plan vertical.

La Figure 5 représente une perspective semblable à celle de la Figure 4, mais avec de nombreux micro-colonnes de fractionnement (2) constituant un lot homogène (1) en ce sens que lesdites micro-colonnes (2) dudit lot (1) ont la même phase stationnaire. A chaque micro-colonne (2) est associé un micro-canal de capture (10), et une micro-colonne secondaire (20), ainsi que plusieurs microleviers (21). Grâce à ce parallélisme, l'ensemble du process sur toutes lesdites micro-colonnes de fractionnement (2) donne lieu en aval à des micro ou nano-élutions secondaires, orthogonales, parallèles, terminales, simultanées, c'est à dire que lesdits produits de fractionnement qui apparaissent en aval desdits micro-canaux de capture (10) sont soumis à des micro ou nano-extractions ou nano-séparations ou nano-digestions secondaires enzymatiques, terminales, parallèles, simultanées.

La Figure 6 représente une perspective du dispositif de capture de la Figure 3 selon une configuration de micro-fabrication où le croisement d'un micro-canal de capture (10) et d'une desdites micro-colonnes de fractionnement (2) s'effectue sur un support dans premier plan vertical, tandis que l'aire de détection (8) avec micro-colonnes secondaires (20) et microleviers (21) est située sur un deuxième support situé dans un plan horizontal, et tandis que les produits d'élution primaire sont évacués par un canal (6) situé sur un autre support situé dans un autre plan horizontal.

La Figure 7 représente une perspective semblable à celle de la Figure 6, mais avec le parallélisme offert par de nombreuses micro-colonnes de fractionnement (2), chacune associée à un micro-canal de capture (10), une micro-colonne secondaire (20) et plusieurs microleviers (21).

- 5 La Figure 8 représente un support intégré (67) pour l'analyse comparative chimique ou biochimique de deux échantillons, de forme rectangulaire, et pourvu de 4 lots (1) de (i) micro-colonnes chromatographiques de fractionnement (2) avec « gradient de longueur » en aval d'une zone d'enrichissement (108), chaque lot ayant les mêmes dispositifs que ceux décrits sur les Figures précédentes.

10

#### DESCRIPTION DE L'INVENTION :

L'invention, bien que non limitée aux échantillons biologiques et applicable aussi aux échantillons chimiques, est essentiellement une technologie alternative aux gels 2-D par comparer deux

- 15 échantillons biologiques, afin de faire une comparaison plus exhaustive, non limitée à un certain type d'analytes, et plus précise.

Un échantillon biologique est caractérisé en particulier par sa composition en chacun(e) des protéines, glycoprotéines, phosphoprotéines, lipoprotéines, lipides, polysaccharides, hormones, vitamines synthétisés de manière permanente ou occasionnelle selon le tissu ou la situation physiologique ou pathologique envisagée. Pour toutes ces alternatives, la technologie de l'invention apporte une réponse de caractérisation différentielle de deux échantillons.

- 20 La technologie de l'invention représente d'abord une technologie miniaturisée et hautement parallèle de fractionnement de deux échantillons qui s'appuie sur un gradient de longueur d'un très grand nombre de micro-canaux ou de micro-colonnes de séparation respectivement par micro-  
25 électrophorèse et micro-chromatographie ou micro-électrochromatographie. Lesdits micro-canaux ou micro-colonnes sont en général précédées en amont de zones d'enrichissement sélectif.

- En bout du micro-canal le plus long ou de la micro-colonne la plus longue pour une zone d'enrichissement, on recueille l'analyte ou les analytes ayant migré le plus vite à travers lesdits micro-canaux ou micro-colonnes. A même moment, en bout du micro-canal le plus court ou de la  
30 microcolonne la plus courte provenant pour ladite zone d'enrichissement, on recueille l'analyte ou les analytes ayant migré le plus lentement travers lesdits micro-canaux ou micro-colonnes. En bout d'un micro-canal de longueur intermédiaire, on recueille l'analyte ou les analytes ayant migré à la vitesse intermédiaire correspondante.

- L' analyte ou les analytes véhiculés puis recueillis en bout de chacune des micro-canaux ou micro-  
35 colonnes, appelés par la suite "produits de fractionnement ", sont d'abord les molécules séparées par électrophorèse ou chromatographie, ensuite les complexes moléculaires non séparés et les agrégats moléculaires non désagrégés ni dans le process préalable d'extraction ni dans le processus de séparation électrophorétique ou chromatographique.

- Dans une version de l'invention, la détection des analytes fractionnés en bout de chaîne de séparation  
40 se fait par spectrométrie de masse. Dans une autre version, ladite détection de fait sur micro-leviers intégrés en bout de chacun des micro-canaux ou micro-colonnes de séparation, les détections différentielles entre deux échantillons pouvant être confirmées par spectrométrie de masse.

L'invention peut aussi utiliser les autres moyens de détection connus de l'Homme de l'Art pour les détections après micro-électrophorèse et micro-chromatographie ou micro-électrochromatographie tels que fluorescence, résonance plasmonique de surface (SPR), résonance magnétique nucléaire (NMR), électrochimie, spectrophotométrie, cette liste n'étant pas limitative.

- 5 Dans une version plus élaborée, l'invention repose sur une configuration miniaturisée et hautement parallèle de couplage de cet ensemble de micro-canaux ou micro-colonnes à un deuxième, voire un troisième ensemble de micro-canaux ou micro-colonnes, chacun ou chacune des micro-canaux ou microcolonnes de séparation du premier ensemble étant individuellement couplé à chacun ou chacune des micro-canaux ou microcolonnes de séparation dudit deuxième ensemble de micro-canaux ou  
10 micro-colonnes.

- De manière plus détaillée, l'invention consiste en des supports intégrés pour analyse comparative chimique ou biochimique de deux échantillons, caractérisés en ce que deux échantillons de nature chimique, ou bien deux échantillons de nature biochimique comme des extraits cellulaires crus ou  
15 issus d'une extraction préalable ou ayant subi une digestion enzymatique, sont soumis à deux process parallèles, les deux échantillons étant analysés séparément respectivement sur deux ensembles homologues (57) de (x) supports intégrés (67) de forme rectangulaire ou en forme de disque, en silicium ou en verre ou en céramique ou en plastique.

Le nombre (x) étant classiquement dans une fourchette de 5 à 50.

- 20 Chaque support intégré (67) est pourvu de (z) lots (1) de (t) micro-colonnes chromatographiques de fractionnement (2) avec « gradient de longueur ».

Le terme « gradient de longueur » s'entend par le fait que chaque micro-colonne de fractionnement (2) ou groupe (3) de micro-colonnes de fractionnement (2) diffère respectivement de sa (son) voisin(e) d'un très petit élément de longueur.

- 25 Ledit très petit élément de longueur se situe classiquement dans une fourchette de 1 à 100 microns. La longueur desdites très nombreuses micro-colonnes de fractionnement (2) varie dans une fourchette de (L1) à (L2), (L1) étant classiquement dans une fourchette de 5 à 20 centimètres, (L2) étant classiquement dans une fourchette de 6 à 40 centimètres.

- Lesdites micro-colonnes de fractionnement (2) pouvant être monolithes, rectilignes ou courbes ou  
30 sinueuses. Elles sont fabriquées en partie ou en totalité grâce aux techniques employées dans la micro-fabrication sur silicium ou verre ou céramique ou plastique.

La nature de la phase stationnaire de l'ensemble desdites (t) micro-colonnes chromatographiques de fractionnement (2) caractérise chacun desdits lots (1) par sa sélectivité.

- Lesdites micro-colonnes chromatographiques de fractionnement (2) ont classiquement un diamètre  
35 avoisinant 10 à 100 microns et sont disposées en forme de lignes parallèles sur un support (67) de forme rectangulaire, ou bien en forme de lignes convergentes sur un support (67) en forme de disque. Chaque support intégré (67) comporte (z x t) micro-colonnes chromatographiques de fractionnement (2).

Le nombre (z) se situe classiquement dans une fourchette de 1 à 5.

- 40 Le nombre (t) se situe classiquement dans une fourchette de 1000 à 10 000, mais peut aussi se situer dans une fourchette de 10 à 1000.

Chaque lot (1) de micro-colonnes de fractionnement (2) peut être précédé spécifiquement d'une colonne d'enrichissement (109) collective ou peut être précédé de plusieurs micro-colonnes d'enrichissement (108) spécifiques d'une partie dudit lot (1).

- La sélectivité d'un desdits lots (1) de micro-colonnes de fractionnement (2) est déterminée
- 5 prioritairement par la polarité intrinsèque et la solvophobicité de sa phase stationnaire et par la polarité, l'amphipaticité et la solvophobicité des groupements fonctionnels qui y sont greffés.
- La sélectivité d'un desdits lots (1) de micro-colonnes de fractionnement (2) est déterminée
- secondairement par d'autres critères comme la micro-porosité, la macro-porosité, l'aptitude à l'échange d'ions ou à l'interaction de paires d'ions ou à l'échange de ligands ou au transfert de charges ou aux
- 10 réactions d'affinité de ladite phase stationnaire ou l'octroi d'un gradient de pH sur la longueur sur toute la longueur desdites micro-colonnes de fractionnement (2), ledit gradient de pH s'étendant sur une fourchette d'autant plus large que lesdites micro-colonnes de fractionnement (2) sont longues.
- Ladite sélectivité est déterminée tertiairement par un champ électrique appliqué aux dites phases stationnaires desdites micro-colonnes de fractionnement (2) (Cf. Method of electric field flow
- 15 fractionation wherein the polarity of the electric field is periodically reversed. US Patent N°6113819).

Dans le process de séparation des échantillons, chaque lot (1) de micro-colonnes de fractionnement (2) reçoit une phase mobile qui lui est propre et en rapport avec la nature de la phase stationnaire de ses micro-colonnes de fractionnement (2).

20

- La Figure 1 représente un support intégré (67) pour l'analyse comparative chimique ou biochimique de deux échantillons, de forme rectangulaire, et pourvu d'un lot (1) de (*t*) micro-colonnes chromatographiques de fractionnement (2) avec « gradient de longueur ». Sur ladite Figure 1, des lots de molécules s'éluent des micro-colonnes de différentes longueurs: la molécule éluee la plus
- 25 facilement sera celle qu'on retrouvera la première en tête de la microcolonne de la plus grande longueur, en même temps que des molécules plus lentes en bout de micro-colonnes plus courtes.

- La Figure 2 représente un support intégré (67) pourvu d'un lot (1) de (*t*) micro-colonnes chromatographiques de fractionnement (2) avec « gradient de longueur », le terme « gradient de
- 30 longueur » s'entendant par le fait que chaque groupe (3) de 4 micro-colonnes de fractionnement (2) diffère de son voisin d'un très petit élément de longueur.

Lesdits deux ensembles homologues (57) appartiennent au même lot de fabrication.

- 35 Chaque échantillon est soumis à une séparation par microchromatographie ou micro-électrochromatographie combinatoire avec ou sans pression dans toutes lesdites micro-colonnes de fractionnement (2) en même temps.
- Les éluents sont spécifiques desdits lots (1), les séparations s'opérant en mode isocratique ou en mode d'élution pas à pas.
- 40 Les produits de fractionnement peuvent à nouveau subir une extraction ou une digestion enzymatique en bout de micro-colonne de fractionnement (2).

La détection s'opère sur une ou plusieurs aires des zones de détection (8) en aval de chaque microcolonne de fractionnement (2) par une des méthodes connues de l'Homme de l'Art pour la détection des éluats de chromatographie directement ou après hyphénation.

- La série d'empreintes successives de détection du premier échantillon est comparée ensuite à la série d'empreintes successives de détection du deuxième échantillon, les séries d'empreintes de détection étant ensuite archivées dans une base de données informatiques.

- Dans une version élaborée, le trajet de chacune desdites micro-colonnes de fractionnement (2) est intersecté à une distance donnée de leur extrémité terminale par un micro-canal de capture (10).
- Chacune desdites micro-colonnes de fractionnement (2) a son micro-canal de capture correspondant (10). Lesdits produits de fractionnement adsorbés à l'instant  $t$  sur une micro-colonne de fractionnement (2) à l'endroit d'intersection avec ledit micro-canal de capture correspondant (10) sont capturés simultanément chacun sur un très petit élément terminal de longueur (Delta L) de ladite micro-colonne de fractionnement (2).
- Ledit micro-canal de capture (10) envoie un micro ou nano-flux d'éluant secondaire au travers de la masse dudit très petit élément de longueur (Delta L) et reprend ledit micro ou nano-flux d'éluant secondaire après son passage au travers de la masse dudit très petit élément de longueur (Delta L). L'ensemble du process sur toutes lesdites microcolonnes de fractionnement (2) donne lieu à des micro ou nano-élutions secondaires, orthogonales, parallèles, terminales, simultanées.
- Lesdits produits de fractionnement qui apparaissent en bout desdites micro-colonnes (2) ou en aval desdits micro-canaux de capture (10) sont soumis à des micro ou nano-extractions ou séparations secondaires, terminales, parallèles, simultanées et à des micro ou nano-digestions secondaires enzymatiques, terminales, parallèles, simultanées sur des micro-composants secondaires tels que micro-colonnes secondaires (20).
- Pour chaque échantillon, on peut procéder à un process d'élution primaire pas à pas dans ( $i$ ) microcolonnes de fractionnement (2) comportant ( $n$ ) pas d'élution primaire. ( $n$ ) est classiquement un nombre variant de 1 à 5.
- Pour chaque pas d'élution primaire, on peut procéder à un process pas à pas de micro ou nano-élutions secondaires emmenées par lesdits micro-canaux de capture (10), ledit process pas à pas de micro ou nano-élutions secondaires comportant ( $m$ ) pas d'élutions pour chaque pas d'élution primaire. ( $m$ ) est classiquement un nombre variant de 1 à 5.
- Le process donne lieu pour chaque micro-colonne de fractionnement (2) à ( $n \times m$ ) micro ou nano-élutions secondaires, et donc à ( $n \times m \times t$ ) micro ou nano-élutions secondaires pour chacun desdits lots (1) de micro-colonnes de fractionnement (2), soit ( $n \times m \times t \times z$ ) micro ou nano-élutions secondaires chacun des ( $x$ ) supports intégrés (67), soit ( $n \times m \times t \times z \times x$ ) micro ou nano-élutions secondaires dans chaque ensemble (57) de supports intégrés (67).
- L'empreinte constituée des ( $n \times m \times t \times z \times x$ ) détections du premier échantillon est comparée à l'empreinte constituée de ( $n \times m \times t \times z \times x$ ) détections du deuxième échantillon.
- Dans un version de l'invention, les gradients d'élution primaire et les gradients d'élution secondaire sont des micro-gradients d'élution.



- Lesdites micro-colonnes de fractionnement (2) et lesdites micro-colonnes secondaires (20) sont fabriquées en partie ou en totalité grâce aux techniques employées dans la micro-fabrication telles que photogravure, micro-moulage, micro-emboutissage, photolymérisation, thermopolymérisation. Chacun desdits supports intégrés (67) peut être en silicium ou en verre ou en céramique ou en
- 5 plastique.
- Les lits desdites micro-colonnes de fractionnement (2) d'un desdits lots (1) desdits supports intégrés (67) peuvent être directement gravés lorsque lesdits supports intégrés (67) sont à base de silicium ou de verre ou de céramique.
- Lesdits lits peuvent aussi être micro-moulés ou micro-emboutis grâce à des matrices en silicium
- 10 lorsque lesdits supports intégrés (67) sont à base de plastiques.
- Lesdits lits peuvent être revêtus d'un film fin de nature hydrophobe ou hydrophile.
- Le réseau micro-particulaire desdites micro-colonnes qui constitue lesdites phases stationnaire peut être obtenu par photogravure lorsque lesdits supports intégrés (67) sont à base de silicium ou de verre ou de céramique.
- 15 Lorsque lesdits supports intégrés (67) sont à base de plastiques, le réseau micro-particulaire peut être obtenu par micro-moulage ou micro-emboutissage ou photopolymérisation ou thermopolymérisation in situ, ou peut être constitué de micro ou nano-baguettes s'insérant dans ledit lit desdites micro-colonnes.
- Ledit réseau micro-particulaire desdites micro-colonnes qui constitue la phase stationnaire peut être
- 20 revêtu d'un film fin de nature hydrophobe ou hydrophile.
- Ledit réseau micro-particulaire peut être soumis à des chimies de couplage connues de l'Homme de l'Art pour greffer des molécules caractérisées par principalement par leur polarité et leur amphipathicité.
- 25 Le revêtement des phases stationnaires avec des peptides peut s'effectuer par greffage, grâce aux chimies de couplage directes ou avec bras espaceurs connues de l'Homme de l'Art, telles que via le bromure de cyanogène, ou le carbodiimide ou le carbonyldiimidazole, ou oxirane ou l'azlactone. Une méthode de plus en plus utilisée est l'immobilisation sur gels tentaculaires de peptides via une fixation par activation de gel epoxy et dérivé azlactone (Prihl M. Bestimmung der Epoxyendgruppen in
- 30 modifizierten chromatographischen Sorbentien und Gelen. Anal. Chem. 1980. 303. 113-116.).
- Le revêtement des phases stationnaires avec lesdits peptides peut aussi s'effectuer par synthèse peptidique en phase solide, la phase solide servant à la synthèse étant aussi ladite phase stationnaire (Kumar KS, Rajasekharan Pillai VN, Das MR. Syntheses of four peptides from the immunodominant region of hepatitis C viral pathogens using PS-TTEGDA support for the investigation of HCV
- 35 infection in human blood. J. Peptide Res., 2000, 56, 88-96)
- Dans une autre version de l'invention, lesdites phases stationnaires desdites micro-colonnes de fractionnements (2) sont greffées de monocouches de lipides de membranes cellulaires tels que par exemple des phosphatidylcholines. (Maget-Dana R. The monolayer technique: a potent tool for
- 40 studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. Biochim Biophys Acta. 1999 Dec 15;1462(1-2):109-40; Mozsolits H, Lee TH, Wirth HJ, Perlmutter P, Aguilar MI. The interaction of bioactive peptides with an immobilized phosphatidylcholine monolayer. Biophys. J, 1999, 1428-1444, 77, 3.)

Dans une version de l'invention, la détection desdits produits de micro ou nano-élution secondaire, desdits produits de micro ou nano-digestion secondaire et desdits produits de micro ou nano-extraction secondaire s'opère par spectrométrie de masse sur lesdites aires de détection (8) en aval de chaque  
 5 micro-canal de capture (10) ou en bout de chaque micro-colonne de fractionnement (2), ladite détection par spectrométrie de masse s'opérant après ionisation en électrospray ou après adsorption sur une nouvelle matrice par ionisation assistée par laser et pouvant être couplée à d'autres méthodes de détection connues de l'Homme de l'Art.

10 Dans une autre version de l'invention, la détection desdits produits de micro ou nano-élution secondaire, desdits produits de micro ou nano-digestion secondaire et desdits produits de micro ou nano-extraction secondaire s'opère dans un premier temps sur micro-leviers sélectifs (21) sur une ou plusieurs aires des zones de détection (8) en aval de chaque micro-canal de capture (10), la sélectivité  
 15 desdits microleviers (21) étant déclinée prioritairement selon la polarité intrinsèque, la solvophobicité et la porosité du matériau qui les constitue ou du film fin qui revêt ledit matériau, et selon la polarité et la solvophobicité des groupements fonctionnels qui y sont greffés, secondairement selon d'autres critères comme l'échange d'ions et l'affinité desdits groupements fonctionnels, des conditions successives de micro-élution secondaire sur les micro-colonnes de fractionnement (2) ainsi que des conditions successives de micro-extraction et de micro-digestion pouvant être conduites en aval  
 20 desdites micro-colonnes de fractionnement (2) ou en aval desdits micro-canaux de capture (10) et en amont desdits micro-leviers (21), des lavages successifs sur les micro-leviers (21) pouvant également être conduits, la rétention des micro-éluates secondaires ou des micro-extraits secondaires ou des produits de digestion secondaires des produits de fractionnements sur les micro-leviers (21) étant mesurée par la déviation ou par la fréquence de vibration desdits micro-leviers (21), plusieurs  
 25 empreintes successives étant enregistrées, la série d'empreintes successives de détection du premier échantillon sur micro-leviers (21) étant comparée ensuite à la série d'empreintes successives de détection sur micro-leviers (21) du deuxième échantillon, la détection desdits micro-éluates secondaires ou desdits micro-extraits secondaires ou desdits produits de digestion secondaires desdits produits de fractionnement s'opérant dans un deuxième temps par spectrométrie de masse, mais  
 30 essentiellement sur les aires de détection (8) où la série d'empreintes par micro-leviers (21) du premier échantillon diffère de la série d'empreintes par micro-leviers (21) du deuxième échantillon.

Dans une autre version de l'invention, la méthode de séparation sur chacune des micro-colonnes de fractionnement (2) s'effectue par une première méthode de chromatographie connue de l'Homme de  
 35 l'Art (par exemple la chromatographie par échange d'ions) pour être suivie après capture des produits de fractionnement par lesdits micro-canaux de capture (10) par une deuxième méthode de chromatographie connue de l'Homme de l'Art (par exemple la chromatographie par interaction hydrophobes) sur des microcolonnes secondaires (20) en aval desdits micro-canaux de capture (10). Les micro-colonnes secondaires (20) peuvent faire appel aux techniques de micro-fabrication  
 40 précédemment évoquées.

La Figure 3 représente le détail du système d'élution digitalisée de l'invention, caractérisé en ce que chaque micro-colonne (2) est intersectée par un micro-canal de capture (10), chaque micro-canal de

capture accédant à une micro-aire de détection (8). Chacune desdites micro-colonnes de fractionnement (2) a son micro-canal de capture correspondant (10). Lesdits produits de fractionnement adsorbés à l'instant  $t$  sur une micro-colonne de fractionnement (2) à l'endroit d'intersection avec ledit micro-canal de capture correspondant (10) sont capturés simultanément

5 chacun sur un très petit élément terminal de longueur (Delta L) de ladite micro-colonne de fractionnement (2). Ledit micro-canal de capture (10) envoie un micro ou nano-flux d'éluant secondaire au travers de la masse dudit très petit élément de longueur (Delta L) et reprend ledit micro ou nano-flux d'éluant secondaire après son passage au travers de la masse dudit très petit élément de longueur (Delta L). L'ensemble du process sur toutes lesdites microcolonnes de fractionnement (2)

10 donne lieu en aval à des micro ou nano-élutions secondaires, orthogonales, parallèles, terminales, simultanées. Lesdits produits de fractionnement qui apparaissent en bout desdites micro-colonnes (2) ou en aval desdits micro-canaux de capture (10) sont soumis à des micro ou nano-extractions ou séparations secondaires, terminales, parallèles, simultanées et des micro ou nano-digestions secondaires enzymatiques, terminales, parallèles, simultanées. Les solvants d'élution ou d'extraction

15 ou de digestion secondaire sont amenés par le canal (15), tandis que les produits d'élution primaire sont collectés dans le canal (6). La méthode de séparation sur chacune des micro-colonnes de fractionnement (2) s'effectue par une première méthode de chromatographie et est suivie, après capture des produits de fractionnement par lesdits micro-canaux de capture (10), par une deuxième méthode de chromatographie pour séparation ou extraction sur des microcolonnes secondaires (20) en

20 aval desdits micro-canaux de capture (10). La détection desdits produits de micro ou nano-élution secondaire, desdits produits de micro ou nano-digestion secondaire et desdits produits de micro ou nano-extraction secondaire s'opère dans un premier temps sur micro-leviers sélectifs (21) sur une ou plusieurs aires des zones de détection (8) en aval de chaque micro-canal de capture (10). Des conditions successives de micro-élution secondaire sur les micro-colonnes de fractionnement (2) ainsi

25 que des conditions successives de micro-extraction et de micro-digestion sont conduites en aval desdites micro-colonnes de fractionnement (2) ou en aval desdits micro-canaux de capture (10) et en amont desdits micro-leviers (21). Des lavages successifs sur les micro-leviers (21) sont également conduits. La rétention des micro-éluates secondaires ou des micro-extraits secondaires ou des produits de digestion secondaires des produits de fractionnements sur les micro-leviers (21) est mesurée par la

30 déviation ou par la fréquence de vibration desdits micro-leviers (21).

La Figure 4 représente une perspective du dispositif de capture de la Figure 3 selon une configuration de micro-fabrication où le croisement d'un micro-canal de capture (10) en aval d'une microcolonne d'enrichissement (108) et d'une desdites micro-colonnes de fractionnement (2) s'effectue sur un

35 support dans premier plan vertical, tandis que l'aire de détection (8) avec micro-colonnes secondaires (20) et microleviers (21) est située sur un deuxième support collé au premier et situé dans un deuxième plan vertical, et tandis que les produits d'élution primaire sont évacués par un canal (6) situé sur support collé au premier et situé dans un troisième plan vertical.

40 La Figure 5 représente une perspective semblable à celle de la Figure 4, mais avec de nombreux micro-colonnes de fractionnement (2) constituant un lot homogène (1) en ce sens que lesdites micro-colonnes (2) dudit lot (1) ont la même phase stationnaire. A chaque micro-colonne (2) est associé un micro-canal de capture (10), et une micro-colonne secondaire (20), ainsi que plusieurs microleviers

(21). Grâce à ce parallélisme, l'ensemble du process sur toutes lesdites microcolonnes de fractionnement (2) donne lieu en aval à des micro ou nano-élutions secondaires, orthogonales, parallèles, terminales, simultanées, c'est à dire que lesdits produits de fractionnement qui apparaissent en aval desdits micro-canaux de capture (10) sont soumis à des micro ou nano-extractions ou nano-séparations ou nano-digestions secondaires enzymatiques, terminales, parallèles, simultanées.

La Figure 6 représente une perspective du dispositif de capture de la Figure 3 selon une configuration de micro-fabrication où le croisement d'un micro-canal de capture (10) et d'une desdites micro-colonnes de fractionnement (2) s'effectue sur un support dans premier plan vertical, tandis que l'aire de détection (8) avec micro-colonnes secondaires (20) et microleviers (21) est située sur un deuxième support situé dans un plan horizontal, et tandis que les produits d'élution primaire sont évacués par un canal (6) situé sur support situé dans un autre plan horizontal.

La Figure 7 représente une perspective semblable à celle de la Figure 6, mais avec le parallélisme offert par de nombreuses micro-colonnes de fractionnement (2) chacune associée à un micro-canal de capture (10), une micro-colonne secondaire (20) et plusieurs microleviers (21).

La Figure 8 représente un support intégré horizontal avec 4 lots (1) de microcolonnes de fractionnement. Lesdites micro-colonnes (2) du premier lot s'inscrivent dans une fourchette de longueur petites. Lesdites micro-colonnes (2) du premier lot s'inscrivent dans une fourchette de longueurs petites. Lesdites micro-colonnes (2) du deuxième lot s'inscrivent dans une fourchette de longueurs plus grandes, celles du troisième lot s'inscrivent dans une fourchette de longueurs encore plus grandes, celles du quatrième lot s'inscrivent dans une fourchette de longueurs encore supérieures. L'accès des analytes à chacun desdits lots (1) de microcolonnes de fractionnements (2) a lieu après franchissement d'une micro-colonne d'enrichissement (108) de forme carrée, au centre de laquelle arrive l'orifice du canal d'introduction de l'échantillon situé dans un plan vertical (non représenté sur ladite figure 8).

Dans une autre version de l'invention, les deux échantillons sont analysés séparément respectivement sur deux ensembles homologues de supports intégrés pourvus de micro-canaux de fractionnement avec gradient de longueur, chaque échantillon étant soumis sur lesdits micro-canaux de fractionnement à une séparation par micro-électrophorèse, de type micro-électrophorèse de zone, ou de type micro-isochatophorèse, ou de type micro-électrophorèse micellaire, ou de type micro-électrophorèse à focalisation iso-électrique obtenue par l'octroi d'un gradient de pH sur la longueur sur toute la longueur desdits micro-canaux, ledit gradient de pH s'étendant sur un fourchette d'autant plus large que lesdites micro-canaux sont longs, le trajet de chacun desdits micro-canaux de fractionnement pouvant être intersecté à une distance donnée de leur extrémité terminale par un micro-canal de capture des produits de fractionnement, chacun desdits micro-canaux de fractionnement ayant son micro-canal de capture correspondant, les produits de fractionnement pouvant à nouveau subir une extraction en bout de micro-canal de fractionnement ou en aval dudit micro-canal de capture, la détection pouvant s'effectuer en aval desdits micro-canaux de fractionnement ou en aval desdits micro-canaux de capture voire desdits micro-canaux secondaires par spectrométrie de masse ou sur micro-leviers, ou par une autre méthode de détection connue de l'Homme de l'Art.

A la lumière des derniers développements technologiques de ces dernières années ayant eu lieu dans la miniaturisation des outils de séparation pour l'analyse chimique et biochimique par micro-  
5 électrophorèse et par micro-électrochromatographie, il n'est plus possible aujourd'hui de faire clairement une distinction entre micro-canaux et micro-colonnes.

Des travaux comme ceux de Fred REGNIER à l'Université de Purdue dans l'Indiana aux USA ont montré que l'on pouvait graver un réseau micro-particulaire sur des micro-canaux, que l'on peut  
10 ensuite fonctionnaliser tout comme l'on peut fonctionnaliser les parois d'un micro-canal (Bing HE, Niall TAIT, Fred REGNIER. Fabrication of nano-columns for liquid chromatography. Anal. Chem. 1998, 70, 3790-3797; Bing HE, Junyan JI, Fred REGNIER. Capillary electrochromatography of peptides in a microfabricated system. Journal of Chromatography A, 1999, 853, 257-262 ; Xiang ZHANG, Fred REGNIER. Analysis of channel-geometry effects on separation efficiency in  
15 rectangular-capillary electrochromatography columns, Journal of Chromatography A, 2000, 869, 319-328.).

D'autre part, on peut pratiquer la micro-électrophorèse sur des micro-canaux qui font 770, voire 430 nanomètres de diamètre intérieur. Ces diamètres entraînent inévitablement une interaction des analytes avec les parois des micro-canaux, ce qui veut dire qu'à ce degré de miniaturisation, l'électrophorèse  
20 dérive inévitablement vers l'électrochromatographie.

En effet, dans l'électrophorèse, la mobilité électrophorétique dans un gel est censée dépendre seulement de la charge et de la masse des molécules. En fait, dans la micro-électrophorèse sur des canaux de très faible diamètre interne ou à section en rectangle très aplati, la mobilité  
25 électrophorétique dépend de la charge et de la masse de l'analyte, mais aussi de son interaction avec les parois du micro-canal.

On voit de plus que si l'on conjugue les deux orientations précédentes, à savoir l'introduction d'un gel pour électrophorèse dans un micro-canal de très faible diamètre ou à section en rectangle très aplati où l'on a gravé ou moulé un réseau micro-particulaire, il n'existe plus aucune distinction possible entre  
30 micro-électrophorèse et micro-électrochromatographie.

Dans l'électrochromatographie, la vitesse de migration de l'analyte est censée dépendre de l'interaction avec la phase stationnaire de la micro-colonne. Dans la pratique de l'électrochromatographie, compte tenu du fait qu'un champ électrique est appliqué d'un bout à l'autre de la micro-colonne pour assurer la migration de la phase mobile, la vitesse de migration de l'analyte  
35 dépend aussi de sa charge et de sa masse, finalement de sa mobilité électrophorétique, comme dans la micro-électrophorèse.

D'autres travaux tendent au rapprochement des deux techniques, comme ceux où l'on effectue des revêtements sur les parois des micro-canaux. On peut par exemple les revêtir d'un film de sol-gel ou de polymère poreux présentant une grande surface d'échange. Cela a été pratiqué en OTC (Open  
40 Tubular Chromatography), c'est à dire en chromatographie en tube ouvert (Cf, Xian HUANG, Jian ZHANG, Csabà HORVATH. Capillary electrochromatography of proteins and peptides with porous-layer open-tubular columns. Journal of Chromatography A, 1999, 858, 91-101). Le fait qu'on ait

affaire à un tube ouvert orienté vers l'appellation micro-canal, mais le fait qu'il y ait un revêtement poreux des parois fait orienter vers l'appellation micro-colonne de chromatographie.

De plus, on effectuait autrefois plutôt la micro-électrophorèse dans des gels hydrophiles. Aujourd'hui  
5 se développe la micro-électrophorèse en milieu non aqueux.

Deux autres techniques font se demander si l'on a affaire à des micro-colonnes ou des micro-canaux, puisqu'elle reviennent à pratiquer la chromatographie sur des micro-canaux sans phase stationnaire, ou encore de la micro-électrophorèse sans gel.

10 Les premières sont parfois qualifiées de « chromatographie à une phase », ou d'« électrophorèse à flux libre », « séparation par couplage flux-force », ou « FFF », pour « Field-Flow-Fractionation » en anglais, ou encore « Free Flow Electrophoresis ». Dans cette technique, l'effet rétentif sur les molécules à séparer dans le micro-canal est obtenu par l'application d'un champ de force extérieure perpendiculaire à l'écoulement (Cf Giddings JC, Fisher SR, Myers MN. Field-Flow Fractionation.  
15 One-Phase chromatography for macro-molecules and particles. American Laboratory. May, 1978, p15.) Entre autres, la force utilisée peut être un champ électrique (il s'agit de la EFFF, pour Electric Field Flow Fractionation). En ce cas, la plupart du temps, les micro-canaux utilisés dans cette technique ont une section en rectangle très aplati. Compte tenu de la forme parabolique du profil de vitesse du vecteur liquide dans le canal, chaque molécule dans le canal se trouve entraînée à une  
20 vitesse caractéristique qui dépend de sa distance moyenne à une des deux parois principales, laquelle dépend de sa mobilité électrophorétique ou de son point iso-électrique. La technique peut être miniaturisée (Cf Gale BK, Caldwell KD, Frazier AB. A micro-machined electrical-field-flow fractionation (mu-EFFF) system. IEEE Trans Biomed Eng 1998, 45 (12), 1459-69). Dans une variante, le champ électrique peut être alternatif (Stevens J. Fractionation of macro-molecules in an alternating  
25 transverse electric field : simulation of the method. J. Biochem Biophys Methods. 1990, 20(4), 275-92 ; Stevens FJ, Method of electric field flow fractionation wherein the polarity of the electric field is periodically reversed. US patent 5 133 844).

Les deuxièmes utilisent des nano-électrodes (Cf US patent US 6 123 819 : nanoelectrode arrays) disposées tout le long du micro-canal de séparation. Les nano-électrodes devant mimer les propriétés  
30 électrostatiques d'un revêtement des parois, il y a interaction entre les parois les molécules à séparer, à la manière d'une séparation chromatographique.

La combinaison possible de plusieurs des techniques précédentes ne permet donc plus faire la  
35 distinction entre micro-canal et micro-colonne.

On peut distinguer des « micro-canaux de nano-diamètre » et « micro-canaux de micro-diamètre ». Le terme « micro-canal de nano-diamètre » peut s'appliquer à un canal miniaturisé, qui peut être configuré en tube ouvert d'une section dont le diamètre est de quelques centaines de nanomètres ou qui peut être configuré selon une section en forme d'un rectangle très aplati dont la longueur est de  
40 quelques microns et dont la largeur très petite de quelques dizaines ou centaines de nanomètres offre un rapprochement des parois avec toute molécule qui y circule, de telle sorte qu'il y ait, à la manière d'une micro-colonne de chromatographie ou d'électro-chromatographie munie d'un réseau micro-particulaire, interaction différentielle entre ses parois et les molécules qui y circulent.

Le terme "micro-canaux de micro-diamètre" peut s'appliquer à des canaux miniaturisés d'un diamètre allant de 1 à quelques dizaines de microns, ou qui sont configurés selon une section en forme de rectangle très aplati dont la longueur est de quelques dizaines de microns et la largeur très petite de l'ordre du micron offre un rapprochement des parois du micro-canal avec toute molécule qui y circule,

Les sus-nommés "micro-canaux de nano-diamètre" et "micro-canaux de micro-diamètre" ont des parois qui peuvent recevoir une gravure ou un moulage mimant un réseau micro-particulaire ou peuvent être revêtues d'un sol-gel ou d'une phase thermopolymérisée ou photopolymérisée mimant le réseau micro-particulaire d'une phase stationnaire de chromatographie ou d'électrochromatographie destiné à interagir différenciellement avec les molécules qui y circulent, et peuvent être remplis ou non d'un sol-gel ou d'une phase thermopolymérisée ou photopolymérisée mimant ledit réseau micro-particulaire,

Les sus-nommés "micro-canal de nano-diamètre" et "micro-canal de micro-diamètre" peuvent être rassemblés sous le terme générique de "micro-canal/micro-colonne", terme générique qui regroupe aussi des "micro-canaux/micro-colonnes" configuré(e)s en "micro-canal de nano-diamètre" sur une partie de leur longueur et en "micro-canal de micro-diamètre" sur une autre partie de leur longueur.

La sélectivité desdit(e)s micro-canaux/micro-colonnes de fractionnement (2) étant déterminée

\*primo par les paramètres physico-chimiques, tels que la charge ou la polarité intrinsèque ou la solvophobie des parois ou du réseau micro-particulaire desdit(e)s micro-canaux/micro-colonnes de fractionnement (2) et par la charge ou la polarité, l'amphipaticité et la solvophobie des groupements fonctionnels qui y sont greffés, ou tels que la capacité d'échange déterminée par la micro-porosité et la macro-porosité de sol-gels ou de phases photopolymérisées ou thermo polymérisées qui constituent le réseau micro-particulaire, ou l'aptitude à l'échange d'ions ou à l'interaction de paires d'ions ou à l'échange de ligands ou au transfert de charges ou aux réactions d'affinité desdits sol-gels ou de phases photopolymérisées ou thermo polymérisées, ou l'octroi d'un gradient de pH sur toute la longueur desdites micro-canaux/micro-colonnes de fractionnement (2), ledit gradient de pH s'étendant sur une fourchette d'autant plus large que lesdit(e)s micro-canaux/micro-colonnes de fractionnement (2) sont long(ue)s,

\*secundo par un champ électrique appliqué perpendiculairement et transversalement auxdit(e)s micro-canaux/micro-colonnes de fractionnement (2) sur tout ou partie de leur longueur,

\*tertio par des nano-électrodes disposées sur tout ou partie de la longueur desdit(e)s micro-canaux/micro-colonnes de fractionnement (2) ,

L'utilisation du terme générique « micro-canal/micro-colonne » est donc justifiée .

Compte tenu de la signification de ce terme générique « micro-canal/micro-colonne », l'invention se rapporte à des supports miniaturisés (67) comportant des centaines de micro-canaux/micro-colonnes (2) avec gradient de longueur, c'est à dire en tuyau d'orgue ou en flûte de pan. Le gradient de longueur permet qu'au moment où un groupe de molécules les plus rapides arrivent en bout du (de la) micro-canal/micro-colonne (2) le (la) plus long(ue), le groupe des molécules les plus lentes arrive en bout du (de la) micro-canal/micro-colonne (2) le (la) plus court(e).

Dans chaque micro-canal/micro-colonne (2), les molécules ou groupes de molécules sont capturées par un micro-canal transversal de capture (10) et envoyées sur une série de micro-leviers (21) différant par leur revêtement plus ou moins adsorbant pour les molécules arrivant par ledit micro-canal de capture (10). L'analyse de la torsion ou de la vibration des très nombreux micro-leviers permet de caractériser l'échantillon. On peut ainsi procéder à l'Analyse Comparative Chimique ou Biochimique de deux échantillons.

Plus en détail, l'invention se rapporte à des supports intégrés miniaturisés (67) pour analyse comparative chimique ou biochimique de deux échantillons, pourvus de centaines de "micro-canaux/micro-colonnes de fractionnement (2)" avec gradients de longueur.

Le terme «gradient de longueur» s'entendant par le fait que chaque micro-canal/micro-colonne de fractionnement (2) ou groupe (3) de micro-canaux/micro-colonnes de fractionnement diffère respectivement de sa (son) voisin(e) d'un très petit élément de longueur, ledit très petit élément de longueur étant classiquement dans une fourchette de 1 à 100 microns, la longueur desdits très nombreux micro-canaux/micro-colonnes de fractionnement (2) variant dans une fourchette de (L1) à (L2), (L1) étant classiquement dans une fourchette de 1 à 20 centimètres, (L2) étant classiquement dans une fourchette de 2 à 40 centimètres,

Le trajet de chacune desdits micro-canaux/micro-colonnes de fractionnement (2) est intersecté à une distance donnée de leur extrémité terminale par un micro-canal de capture (10).,

Chacun(e) desdits micro-canaux /micro-colonnes de fractionnement (2) ayant son micro-canal de capture correspondant (10).

Lesdits produits de fractionnement présents à l'instant  $t$  à l'endroit d'intersection dudit (deladite) micro-canal/micro-colonne de fractionnement (2) avec ledit micro-canal de capture correspondant (10) sont capturés simultanément chacun sur un très petit élément de longueur (Delta L) dudit (de ladite) micro-canal/micro-colonne de fractionnement (2).

Ledit micro-canal de capture (10) envoie un micro ou nano-flux secondaire au travers dudit très petit élément de longueur (Delta L) et le reprend après son passage au travers dudit très petit élément de longueur (Delta L), chaque capture s'appuyant sur une condition physique ou chimique ou hydrodynamique précise régnant à l'intersection dudit (deladite) micro-canal/micro-colonne de fractionnement (2) avec ledit micro-canal de capture (10).

Lesdits produits de fractionnement qui apparaissent aux intersections desdits micro-canaux/micro-colonnes de fractionnement (2) et desdits micro-canaux de capture (10) peuvent être soumis à des micro-extractions ou électro-extractions ou séparations ou à des micro ou nano-digestions enzymatiques secondaires, lesdits micro-canaux de capture (10) menant à une série de micro-leviers sélectifs (21).



Lesdits produits de fractionnement sont d'abord les molécules séparées, ensuite les complexes moléculaires non séparés et les agrégats moléculaires non désagregés ni dans le process préalable d'extraction ni dans le processus de séparation,

5 La détection des molécules capturées par les micro-canaux de capture (10) s'opère dans un premier temps sur lesdits micro-leviers sélectifs (21) sur lesquels débouchent lesdits micro-canaux de capture (10).

10 La sélectivité desdits microleviers (21) est declinée prioritairement selon la polarité intrinsèque, la solvophobicité et la porosité du matériau qui les constitue ou du film fin qui revêt ledit matériau, et selon lacharge ou la polarité et la solvophobicité des groupements fonctionnels qui y sont greffés, secondairement selon d'autres critères comme par exemple l'échange d'ions et l'affinité desdits groupements fonctionnels.

Des lavages successifs sur les micro-leviers (21) peuvent être conduits,

15 La rétention des produits de fractionnement sur les micro-leviers (21) est mesurée par la déviation ou par la fréquence de vibration desdits micro-leviers (21)

Plusieurs empreintes successives sont enregistrées, la série d'empreintes successives de détection sur micro-leviers (21) d'un premier échantillon est comparée ensuite par des moyens informatiques à la série d'empreintes successives de détection sur micro-leviers (21) d'un deuxième échantillon.

20 Lesdits supports intégrés miniaturisés (67) reçoivent des micro-canaux/micro-colonnes de fractionnement (2) rectilignes ou courbes ou sinueux(ses), disposé(e)s en forme de lignes parallèles ou bien disposées en hyper-étoile, c'est à dire en forme de lignes convergentes, chaque lot (1) de micro-canaux/micro-colonnes de fractionnement (2) étant précédé spécifiquement d'une colonne d'enrichissement (108) collective ou précédé de plusieurs micro-colonnes d'enrichissement (108)  
25 spécifiques.

Dans un process d'élution primaire pas à pas dans des séparations par micro-chromatographie ou micro-électrochromatographie dans chaque micro-canal/microcolonne de fractionnement (2), on procède, pour chaque pas d'élution primaire, à un process pas à pas de capture des molécules présentes  
30 à l'intersection desdit(e)s micro-canaux/micro-colonnes de fractionnement (2) et micro-canaux de capture (10), chaque pas de capture s'appuyant sur une condition physique ou chimique ou hydrodynamique précise régnant à l'intersection dudit (deladite) micro-canal/micro-colonne de fractionnement (2) avec ledit micro-canal de capture (10).

35

40

## EXEMPLES D'APPLICATIONS:

- 5 Dans un premier exemple d'application, on compare deux échantillons biologiques, chacun étant analysé sur 8 supports intégrés (67) dont la configuration est du type de celles décrites sur la Figure 8, d'un format particulier appelé ici (FC, 4, 1000, 20, 12-14, 14-16, 16-18, 18-20) ou plus simplement (FC, 4, 1000, 20, 12-20).
- Chacun de ces supports (67) est soumis des chromatographies sous pression, et peut aussi être soumis à des électrochromatographies suppléées par pression complémentaire.
- 10 Pour chacun de ces supports (67) de format (FC, 4, 1000, 20, 12-20), l'accès des analytes à chacun desdits lots (1) de microcolonnes de fractionnements (2) a lieu après franchissement d'une micro-colonne d'enrichissement (108) de forme carrée, au centre de laquelle arrive l'orifice du canal d'introduction de l'échantillon situé dans un plan vertical (non représenté sur ladite figure 8).
- Chacun desdits (FC, 4, 1000, 20, 12-20) contient 4 lots de 1000 microcolonnes de fractionnement
- 15 (2). Le gradient de longueur est de 20 microns, si bien qu'entre la plus première et la dernière de 1000 micro-colonne, il existe une différence de longueur de 20 mm. Les 1000 microcolonnes de fractionnement du premier lot (1) exploitent une fourchette de longueur de 12 à 14 cm, les 1000 microcolonnes du deuxième lot exploitent une fourchette de longueur de 14 à 16 cm, les 1000 microcolonnes du troisième lot exploitent une fourchette de longueur de 16 à 18 cm, les 1000
- 20 microcolonnes du quatrième lot exploitent une fourchette de longueur de 18 à 20 cm.
- L'abréviation (FC, 4, 1000, 20, 12-14, 14-16, 16-18, 18-20) vaut pour "Format Carré, 4 lots de 1000 micro-colonnes, 20 microns de gradient de longueur, 1er lot de micro-colonnes de 12 à 14 cm, deuxième lot de micro-colonnes de 14 à 16 cm, troisième lot de micro-colonnes de 16 à 18 cm, quatrième lot de micro-colonnes de 18 à 20 cm".
- 25 L'abréviation (FC, 4, 1000, 20, 12-20) vaut pour "Format Carré, 4 lots de 1000 micro-colonnes, 20 microns de gradient de longueur, fourchette totale de longueur des microcolonnes de fractionnement de 12 à 20 cm".
- Chacune desdites micro-colonnes de fractionnement (2) est intersectée par un micro-canal de capture (10) dérivé d'une rampe d'élution secondaire (15). Les produits de fractionnement adsorbés à l'instant
- 30 t sur une micro-colonne de fractionnement (2) à l'endroit d'intersection avec ledit micro-canal de capture correspondant (10) sont capturés simultanément chacun sur un très petit élément terminal de longueur (Delta L) de ladite micro-colonne de fractionnement (2).
- Ledit micro-canal de capture (10) envoie un micro ou nano-flux d'éluant secondaire au travers de la masse dudit très petit élément de longueur (Delta L) et reprend ledit micro ou nano-flux d'éluant
- 35 secondaire après son passage au travers de la masse dudit très petit élément de longueur (Delta L).
- L'ensemble du processus sur toutes lesdites microcolonnes de fractionnement (2) donne lieu à des micro ou nano-élutions secondaires, orthogonales, parallèles, terminales, simultanées.
- Chaque micro-canal de capture (10) débouche, sur une zone de détection, sur 8 microleviers (21).
- Chacun de ces microleviers peut être soumis à une détection optique.
- 40 Les phases stationnaires des micro-colonnes de fractionnement (2) du premier des 8 supports (FC, 4, 1000, 20, 12-20), appelé (FC, 4, 1000, 20, 12-20)-C30, sont greffées avec des molécules chaînes alkyl C30.

- Celles du deuxième des 8 supports (FC, 4, 1000, 20, 12-20), appelé (FC, 4, 1000, 20, 12-20)- butyl, sont greffées avec des molécules butyl.
- Celles du troisième des 8 supports (FC, 4, 1000, 20, 12-20), appelé (FC, 4, 1000, 20, 12-20)- cyclohexyl, sont greffées avec des molécules cyclo-hexyl.
- 5 Celles du quatrième des 8 supports (FC, 4, 1000, 20, 12-20), appelé (FC, 4, 1000, 20, 12-20)- phenyl, sont greffées avec des molécules phenyl
- Celles du cinquième des 8 supports (FC, 4, 1000, 20, 12-20), appelé (FC, 4, 1000, 20, 12-20)- ethyl, sont greffées avec des molécules ethyl
- Celles du sixième des 8 supports (FC, 4, 1000, 20, 12-20), appelé (FC, 4, 1000, 20, 12-20)- amino-propyl, sont greffées avec des molécules amino-propyl.
- 10 Celles du septième des 8 supports (FC, 4, 1000, 20, 12-20), appelé (FC, 4, 1000, 20, 12-20)- dihydroxypropyl, sont greffées avec des molécules dihydroxypropyl.
- Celles du huitième des 8 supports (FC, 4, 1000, 20, 12-20), appelé (FC, 4, 1000, 20, 12-20)- cyanopropyl, sont greffées avec des molécules cyanopropyl
- 15 Les 8 microleviers sur lesquels débouchent lesdits micro-canaux de capture (10) ont chacun un revêtement spécifique. Par exemple, le premier peut avoir un revêtement à base de chaînes alkyl C30, le deuxième un revêtement à base de chaînes octadecyl, le troisième un revêtement à base de chaînes octyl, le quatrième à bases de chaînes butyl, le quatrième à base de chaînes phenyl, le cinquième à base de chaînes cyclo-hexyl, le cinquième à base de chaînes ethyl, le sixième à base de chaînes amino-propyles, le septième à base de chaînes dihydroxypropyl, le huitième à base de chaînes cyanopropyl.
- 20 Les solvants de base pour les éluions primaires des chromatographies de fractionnement effectuées sur les supports (67) de format (FC 4, 1000, 20, 12-20) peuvent être des mélanges ternaires eau, acide trifluoro-acétique (TFA), acétonitrile. Le solvant A initial peut être (eau, 10% acétonitrile, TFA 0,1%).
- 5 paliers d'éluion primaires peuvent être appliqués: (eau, 15% acétonitrile, TFA 0,1%), (eau, 20% acétonitrile, TFA 0,1%), (eau, 25% acétonitrile, TFA 0,1%), (eau, 30% acétonitrile, TFA 0,1%), (eau, 35% acétonitrile, TFA 0,1%).
- 25 4 paliers d'éluion secondaire peuvent être appliqués pour chaque palier d'éluion primaire. Par exemple pour le premier palier d'éluion primaire: (eau, 15% acétonitrile, TFA 0,1%), les 4 paliers d'éluion secondaire peuvent être (eau, 16% acétonitrile, TFA 0,1%), (eau, 17% acétonitrile, TFA 0,1%), (eau, 18% acétonitrile, TFA 0,1%), (eau, 19% acétonitrile, TFA 0,1%).
- 30 La série d'empreintes successives sur micro-leviers de détection du premier échantillon est comparée ensuite à la série d'empreintes successives de détection du deuxième échantillon, les séries d'empreintes de détection étant ensuite archivées dans une base de données informatiques.
- Là où sont détectées des différences, les fractionnements sont prélevés et analysés par l'une des
- 35 nombreuses méthodes d'analyse connues de l'Homme de l'Art.
- Le procédé est applicable toute recherche d'expression différentielle de protéines pour un tissu donné et dans le contexte de la comparaison d'un individu sain et d'un individu souffrant d'une pathologie Il est applicable également à la comparaison de l'expression des protéines dans deux situations pathologiques différentes. Il aussi applicable à la comparaison de l'expression de protéines chez deux
- 40 deux souches de micro-organismes (virus, bactéries, levures), ou applicables à la détection d'expressions différentielles de protéines sur micro-organismes (virus, bactéries, levures) soumis à des stimuli précis.

Dans un deuxième exemple d'application, on utilise le dispositif pour comparer spécifiquement l'expression de protéines basiques entre deux échantillons.

- 5 Chaque échantillon est analysé sur un support intégré (67) dont la configuration est du type de celles décrites sur la Figure 8, dudit format (FC, 4, 20, 12-20). Ces supports intégrés sont en plastique, possèdent 4 lots de 1000 micro-colonnes de fractionnement (2) monolithes macroporeuses synthétisées in situ, avec gradient de longueur de 20 microns. Lesdites microcolonnes de fractionnement (2) sont à caractère fortement zwitterionique et contiennent des copolymères à base
- 10 de sulfoalkylbetaine (N,N-diméthyl-N-méthacryloyloxyéthyl-N-(3-sulfopropyl) ammonium betaine (Cf. Viklund C, Sjorgen A, Irgum K, Nes I. Anal. Chem. 2001. Feb 1, 73,(3) , 444-52). Les protéines basiques sont fractionnées dans lesdites micro-colonnes de fractionnement (2) selon différentes avec des éluions primaires (éluant A :eau; éluant B: eau, 10 mM phosphate de sodium) . Les éluions secondaires par lesdits micro-canaux de capture (10) sont modulées par des ions
- 15 thiocyanate (éluant primaire + 10 mM thiocyanate) ou par des ions perchlorate (éluant primaire + 10 mM perchlorate) .
- La série d'empreintes successives sur micro-leviers de détection du premier échantillon est comparée ensuite à la série d'empreintes successives de détection du deuxième échantillon, les séries d'empreintes de détection étant ensuite archivées dans une base de données informatiques.
- 20 Là où sont détectées des différences, les fractionnements sont prélevés et analysés par l'une des nombreuses méthodes d'analyse connues de l'Homme de l'Art.

Dans un troisième exemple d'application, on utilise le dispositif pour comparer spécifiquement l'expression de peptides et de protéines membranaires.

- 25 Chaque échantillon est analysé sur deux support intégrés (67) dont la configuration est du type de celles décrites sur la Figure 8, dudit format (FC4, 20, 12-20). Chacun des deux supports intégrés possède 4 lots de 1000 micro-colonnes greffées avec des chaînes alkyles C4 et avec gradient de longueur.
- Dans le premier support intégré, les peptides membranaires sont dissouts dans le dichlorométhane (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)-hexafluoro-2-propanol (HFIP) (4:1) contenant des traces de pyridine, puis fractionnées
- 30 dans lesdites micro-colonnes de fractionnement (2) selon différentes éluions primaires à base de mélanges de l'éluant A (acide formique-eau (2:3)) d'une part et de l'éluant B (acide formique -2-propanol (4:1)) d'autre part . Les paliers sont (A 100%, B 0%; A 80%, B 20%; A 60%, B 40%; A 40%, B 60%; A 20%, B 80%; A 0%, B 100%; ).
- 35 3 paliers d'éluion secondaire par lesdits micro-canaux de capture (10) sont appliqués pour chaque palier d'éluion primaire. Par exemple pour le premier palier d'éluion primaire, (A 95%, B 5%; A 90%, B 10%; A 85%, B 15%).
- Dans le deuxième support intégré, les protéines membranaires, après extraction au Triton X-114, précipitation à l'éthanol à 90% et redissolution dans l'acide formique à 65%, sont fractionnées dans
- 40 lesdites micro-colonnes de fractionnement (2) selon différentes éluions primaires à base de mélanges de l'éluant A (acide formique -eau (65:35)) et de l'éluant B (acétonitrile -eau (65:35)). Les paliers sont (A 100%, B 0%; A 80%, B 20%; A 60%, B 40%; A 40%, B 60%; A 20%, B 80%; A 0%, B 100%; ).

3 paliers d'élution secondaire par lesdits micro-canaux de capture (10) sont appliqués pour chaque palier d'élution primaire. Par exemple pour le premier palier d'élution primaire, (A 95%, B 5%; A 90%, B 10%; A 85%, B 15%).

La série d'empreintes successives sur micro-leviers de détection du premier échantillon est comparée ensuite à la série d'empreintes successives de détection du deuxième échantillon, les séries d'empreintes de détection étant ensuite archivées dans une base de données informatiques. Là où sont détectées des différences, les fractionnements sont prélevés et analysés par l'une des nombreuses méthodes d'analyse connues de l'Homme de l'Art.

- 10 Dans un quatrième exemple d'application, on utilise les données acquises par le dispositif décrit précédent pour configurer un test rapide sur consommable miniaturisé.
- Ce test est constitué de supports pourvus seulement des microcolonnes de fractionnement (2) où de nombreuses comparaisons ont montré des différences d'empreintes reproductibles pour une pathologie donnée. L'individu sain montre une empreinte A, l'individu atteint de ladite pathologie montre une
- 15 empreinte B. Un premier support (sA) est dédié à la reconnaissance de l'empreinte A, un deuxième support (sB) est dédié à la reconnaissance de l'empreinte B. Tant pour la fabrication dudit support (sA) que pour la fabrication dudit support (sB), les seules micro-colonnes où il y a toujours un même différentiel sont conservées. Elles restent par ailleurs pourvues chacune d'un micro-canal de capture (10) débouchant sur une série de micro-leviers (21).
- 20 Dans ce test ciblé sur ladite pathologie, le nombre de microcolonnes, de microcanaux et de microleviers est très réduit, mais parfaitement centré sur la pathologie ciblée.

25

30

35

40

### Revendications

1. Dispositif d'analyse chimique ou biochimique d'échantillons  
5 biologique ou chimique, notamment pour une analyse comparative d'au moins deux échantillons, caractérisé par le fait qu'il comprend une pluralité de micro-colonnes de fractionnement (2) de constituants d'un échantillon, chaque micro-colonne de fractionnement (2) comprenant un micro-canal muni d'un orifice d'introduction d'un éluant enrichi en échantillon, un orifice d'évacuation situé à  
10 une extrémité terminale et de moyens de sélection intermédiaires, des moyens fluidiques de capture (10) d'un produit de fractionnement au niveau d'un élément terminal de chaque micro-colonne de fractionnement (2) situé en amont de son orifice d'évacuation, et des ensembles de micro-leviers sélectifs (21) associés aux micro-colonnes de fractionnement (2), un micro-levier (21) comportant des  
15 moyens de détection reliés à des moyens d'analyse.
2. Dispositif selon la revendication 1, caractérisé par le fait qu'une micro-colonne de fractionnement (2) ou un groupe (3) de micro-colonnes de fractionnement de même longueur diffère par sa longueur des autres micro-  
20 colonnes de fractionnement (2) ou groupes (3) de micro-colonnes de fractionnement, les éléments terminaux étant situés sur chaque micro-colonne de fractionnement (2) à une distance donnée de l'extrémité terminale de la micro-colonne de fractionnement (2).
- 25 3. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé par le fait que chaque micro-colonne de fractionnement (2) diffère d'une micro-colonne de fractionnement (2) immédiatement plus longue par un élément de longueur donné.
- 30 4. Dispositif selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait qu'il comprend des micro-colonnes de fractionnement secondaire (20) situées en aval des moyens fluidiques de capture (10) et en amont de l'ensemble de micro-leviers (21) associé à une micro-colonne de fractionnement (2), et destinées au fractionnement secondaire des produits de  
35 fractionnement capturées.

5. Dispositif selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait qu'il comprend plusieurs lots de micro-colonnes de fractionnement (2), chaque lot de micro-colonnes de fractionnement (2) possédant une sélectivité déterminée par les moyens de sélection de ses micro-colonnes de fractionnement (2) comprenant une phase stationnaire revêtue ou non et/ou des moyens électriques de sélection.
6. Dispositif selon la revendication 7, caractérisé par le fait qu'il comprend un support (67) portant plusieurs lots de micro-colonnes de fractionnement (2), des moyens de captures (10) et des ensembles de micro-leviers (21) associés, et un canal d'alimentation de l'ensemble des lots de micro-colonnes de fractionnement.
7. Dispositif selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que les micro-leviers sélectifs (21) comprennent des moyens de détection en fonction de leur état de surface ou de l'état de surface d'un revêtement, de leur nature chimique ou de la nature chimique d'un revêtement.
8. Dispositif selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que les micro-colonnes (2) présentent un diamètre compris entre 10 microns ( $\mu\text{m}$ ) et 100 microns ( $\mu\text{m}$ ).
9. Dispositif selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait qu'il comprend un support de fractionnement (67) portant les micro-colonnes de fractionnement (2) et un support de détection (8) portant les micro-leviers (21), les supports étant sensiblement plans, et les supports étant sensiblement parallèles ou perpendiculaires entre eux.
10. Ensemble d'analyse comparative chimique ou biochimique d'au moins deux échantillons biologiques ou chimiques caractérisé par le fait qu'il comprend au moins deux dispositifs comprenant une pluralité de micro-colonnes de fractionnement (2) de constituants d'un échantillon, chaque micro-colonne de fractionnement (2) comprenant un micro-canal muni d'un orifice d'introduction d'un éluant enrichi en échantillon, un orifice d'évacuation situé à une extrémité

terminale et de moyens de sélection intermédiaires, des moyens fluidiques de capture (10) d'un produit de fractionnement au niveau d'un élément terminal de chaque micro-colonne de fractionnement (2) situé en amont de son orifice d'évacuation, et des ensembles de micro-leviers sélectifs (21) associés aux micro-  
5 colonnes de fractionnement (2), un micro-levier (21) comportant des moyens de détection reliés à des moyens d'analyse.

1 1 Procédé d'analyse chimique ou biochimique d'échantillons biologique ou chimique, caractérisé par le fait qu'on réalise des fractionnements  
10 différentiels d'un éluant enrichi en échantillon, on capture simultanément différents produits de fractionnement obtenus, et on analyse chacun des produits de fractionnement à l'aide d'un ensemble de micro-leviers sélectifs.

12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé par le fait que l'on  
15 fractionne un produit de fractionnement capturé avant de l'analyser.

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 11 ou 12, caractérisé par le fait que l'on détecte des constituants d'un produit de fractionnement à l'aide des micro-leviers (21), selon des caractéristiques de  
20 polarité, solvophobicité ou porosité du matériau qui les constitue ou d'un revêtement des micro-leviers, ou selon des caractéristiques de polarité, solvophobicité, échange d'ion ou affinité avec des groupement fonctionnels greffés sur les micro-leviers.

25 14. Procédé selon l'une quelconque des revendications 11 à 13, caractérisé par le fait que l'on fractionne l'échantillon par chromatographie, par micro-électrophorèse, ou par interaction avec des nano-électrodes.

15. Procédé selon l'une quelconque des revendications 11 à 14, caractérisé par le fait que l'on analyse la déviation ou la fréquence de vibration  
30 des micro-leviers (21).

16. Procédé selon l'une quelconque des revendications 11 à 15, caractérisé par le fait que l'on analyse les éléments de fractionnement par  
35 spectrométrie de masse, avant ou après l'analyse à l'aide des micro-leviers (21).



17. Procédé selon l'une quelconque des revendications 11 à 16, caractérisé par le fait que l'on analyse un premier échantillon, on analyse un second échantillon, et on compare les résultats d'analyse des deux échantillons.

5

18. Procédé selon la revendication 17, caractérisé par le fait qu'on analyse les premier et second échantillons en vue de la comparaison d'empreintes de protéines des échantillons, à l'aide de micro-leviers sélectifs aptes à montrer une empreinte de protéines différentielle.



2/8

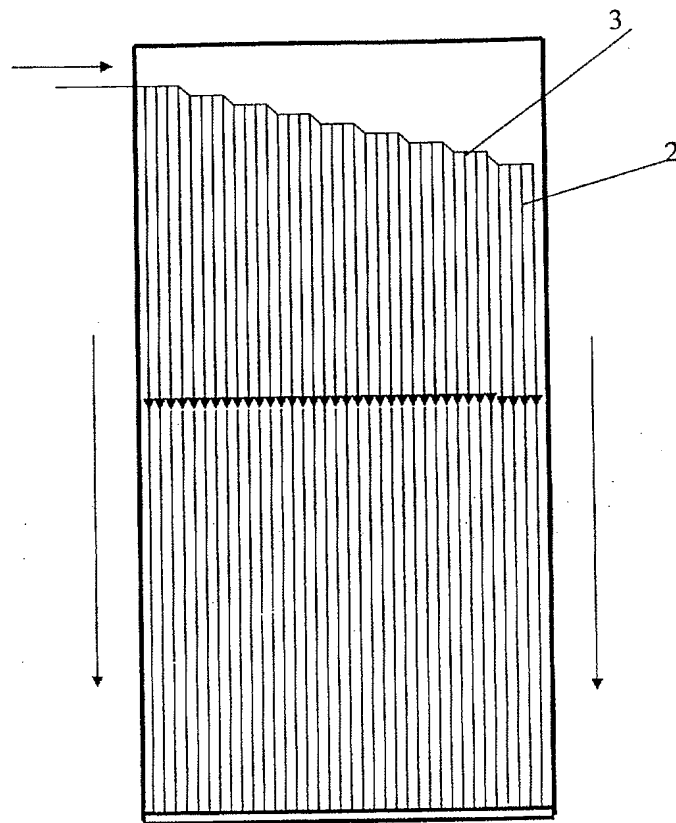


FIG. 2

3/8

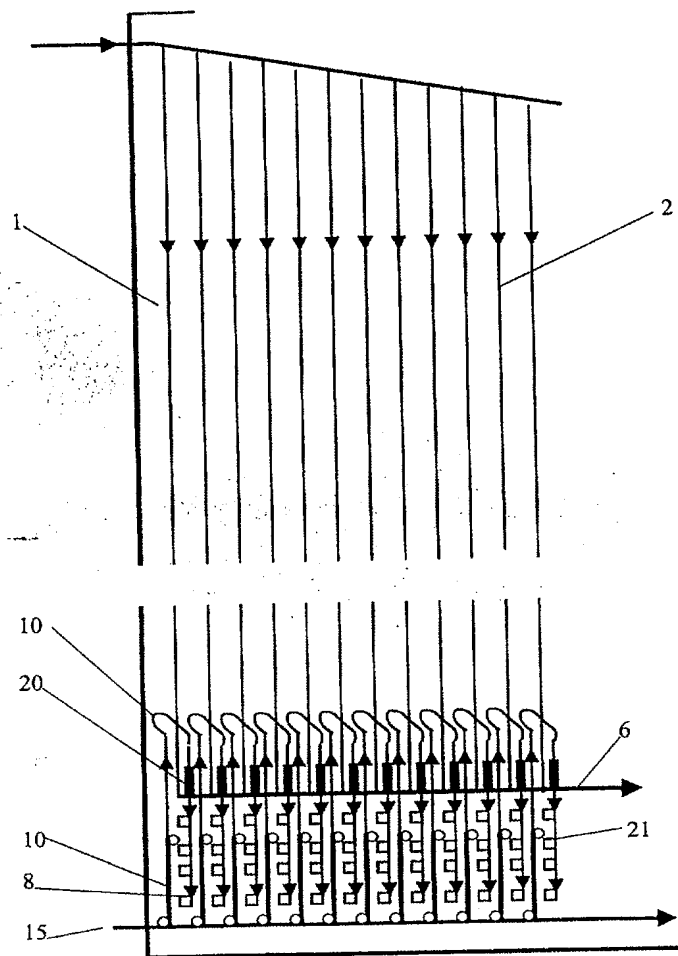


FIG. 3



5/8

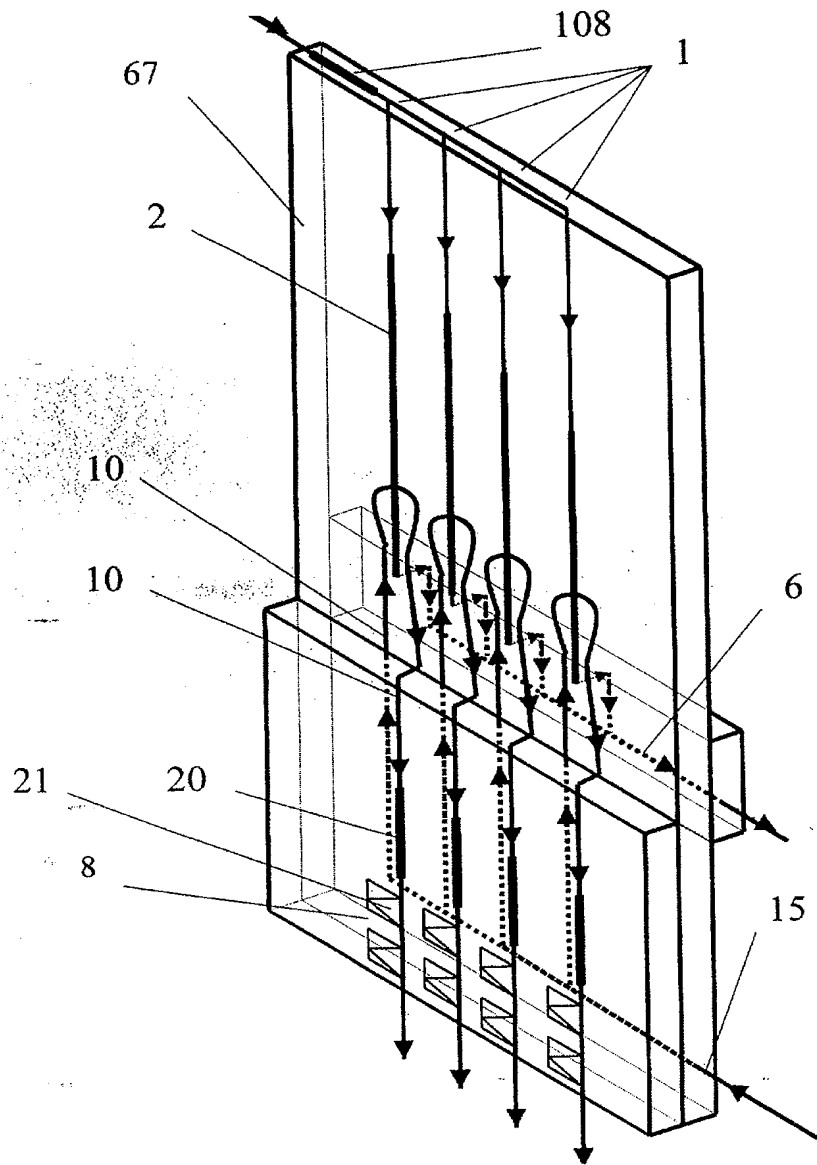


FIG. 5

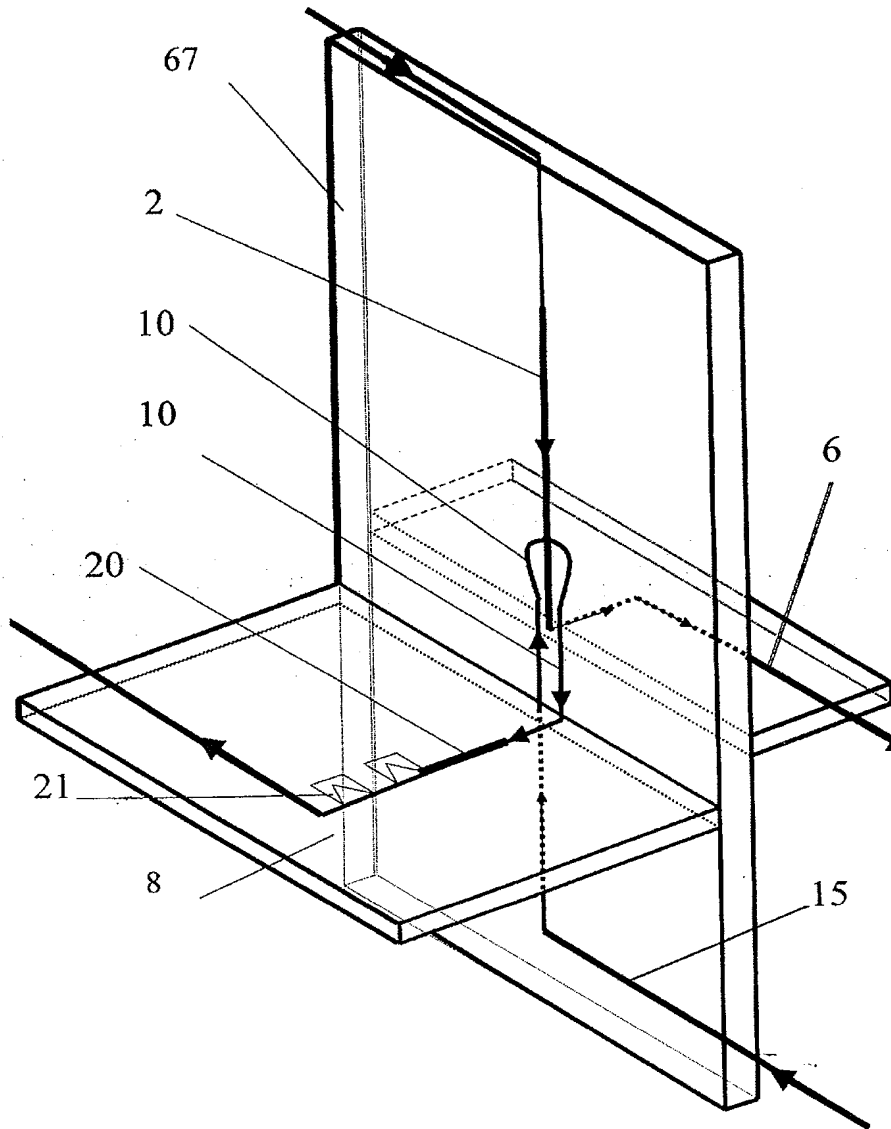


FIG. 6

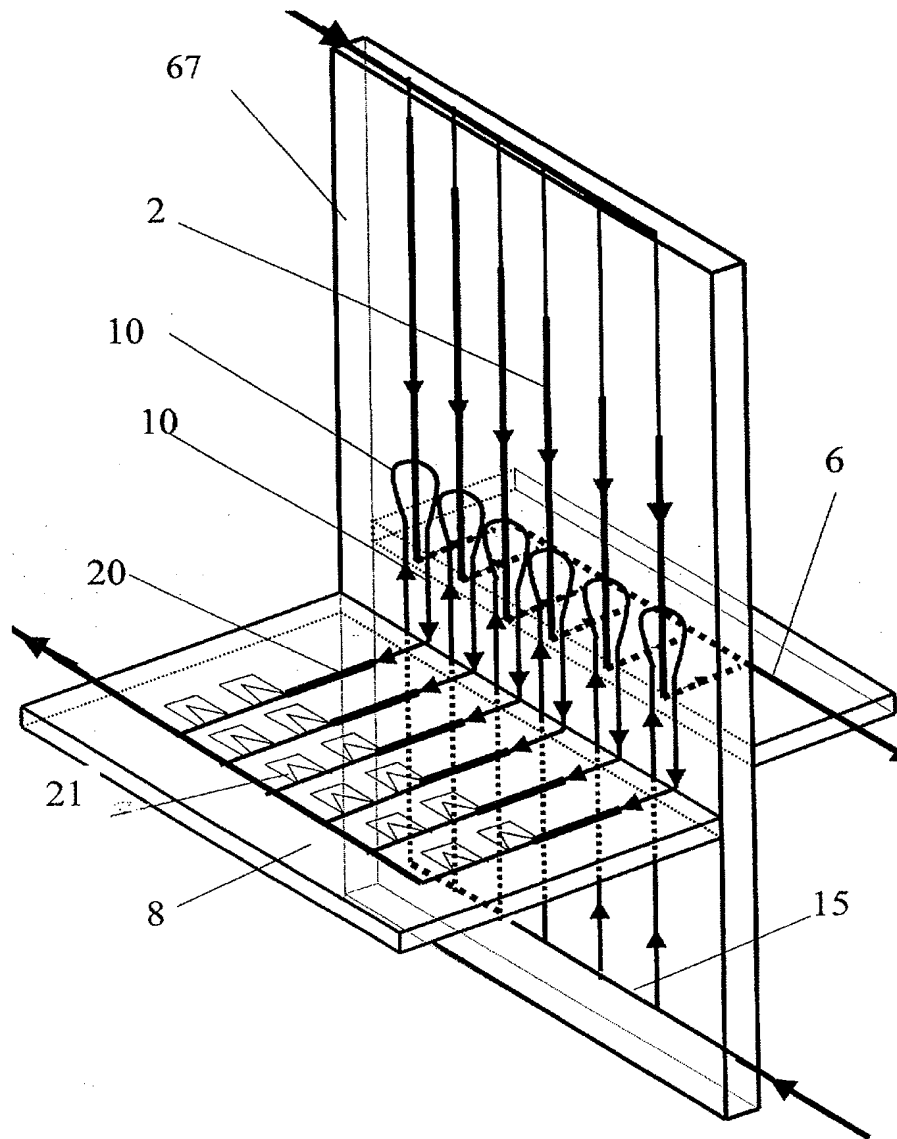


FIG. 7



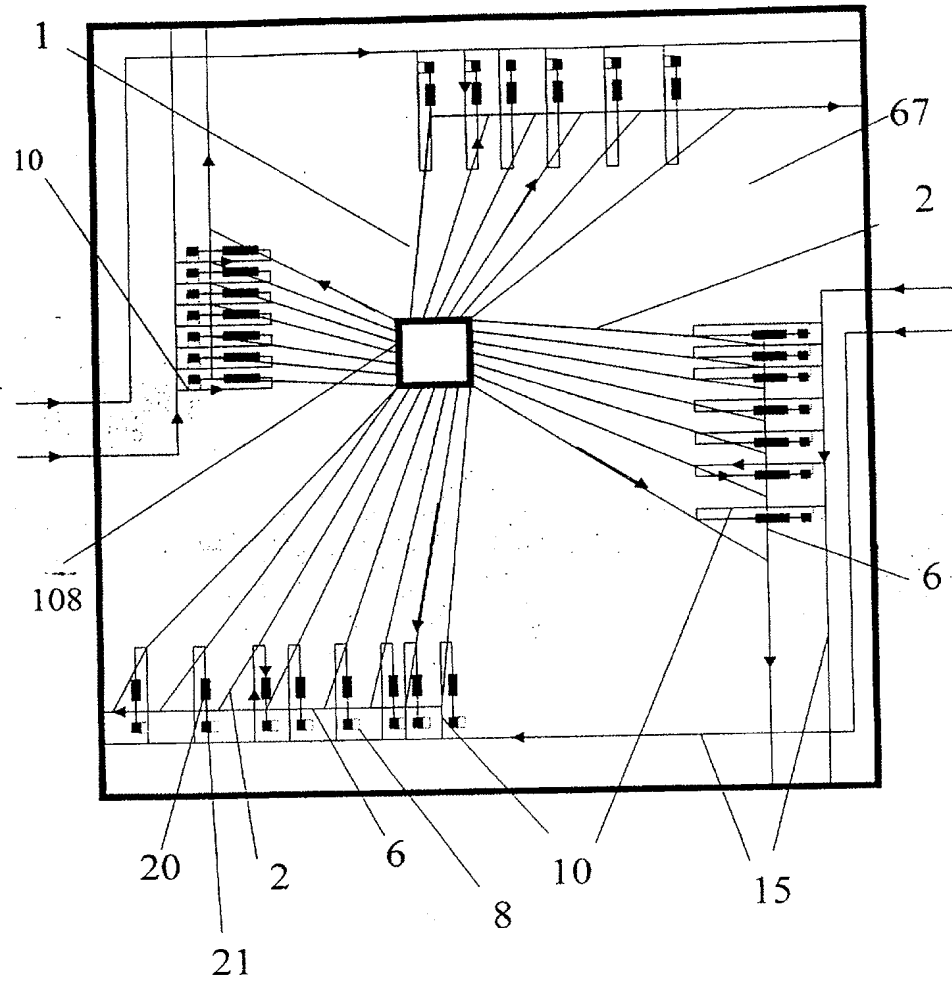


FIG. 8



# RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

2825649

N° d'enregistrement  
nationalFA 612969  
FR 0107537

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
Y	US 6 120 666 A (JACOBSON STEPHEN C ET AL) 19 septembre 2000 (2000-09-19) * colonne 1, ligne 15-22 * * colonne 1, ligne 46-67 * * colonne 3, ligne 24-33 * * colonne 6, ligne 9-40; figure 3 * ----	1,10	B01J19/00 G01N30/88 B01L3/00
Y	WO 98 50154 A (UNIV MINNESOTA) 12 novembre 1998 (1998-11-12) * page 8, ligne 17 - page 9, ligne 16 * ----	1,10	
Y	US 4 935 040 A (GOEDERT MICHEL G) 19 juin 1990 (1990-06-19) * colonne 4, ligne 20 - colonne 5, ligne 12 * * colonne 7, ligne 25-52 * ----	11,13,14	
Y	US 4 928 513 A (SUGIHARA TAKASHI ET AL) 29 mai 1990 (1990-05-29) * colonne 1, ligne 5-12 * * colonne 2, ligne 5-35 * * colonne 3, ligne 1-6 * ----	11,13,14	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
A	US 4 908 112 A (PACE SALVATORE J) 13 mars 1990 (1990-03-13) * colonne 9, ligne 38-50; figure 7 * ----	2	GOIN
A	US 4 891 120 A (BRETTLE JACK ET AL) 2 janvier 1990 (1990-01-02) * colonne 4, ligne 14-23; figure 11; exemple 1 * * colonne 5, ligne 36,37 * -----	1	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
12 avril 2002		Zinngrebe, U	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			

2825649

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE  
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0107537 FA 612969**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.  
Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 12-04-2002  
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 6120666 A	19-09-2000	US 5858187 A AU 744627 B2 AU 4569699 A EP 1093579 A1 WO 9966318 A1	12-01-1999 28-02-2002 05-01-2000 25-04-2001 23-12-1999
WO 9850154 A	12-11-1998	US 6054277 A WO 9850154 A1 US 6303288 B1	25-04-2000 12-11-1998 16-10-2001
US 4935040 A	19-06-1990	AUCUN	
US 4928513 A	29-05-1990	JP 7095002 B JP 63263426 A JP 63289443 A JP 63293459 A DE 3724966 A1 GB 2194845 A ,B JP 63145954 A	11-10-1995 31-10-1988 25-11-1988 30-11-1988 04-02-1988 16-03-1988 18-06-1988
US 4908112 A	13-03-1990	AUCUN	
US 4891120 A	02-01-1990	GB 2191110 A AT 62998 T DE 3769602 D1 EP 0268648 A1 WO 8707953 A2	09-12-1987 15-05-1991 29-05-1991 01-06-1988 30-12-1987

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82